(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118843473 A
(43)申请公布日 2024.10.25

(21)申请号 202380026584.7
(22)申请日 2023.02.08
(30)优先权数据
63/307,963 2022.02.08 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/062231 2023.02.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/154763 EN 2023.08.17
(71)申请人 太空飞船七有限责任公司
地址 美国
(72)发明人 C·D·赫尔佐格
C·B·萨克拉门多
R·普拉巴卡尔
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 刘晓东
(51)Int.Cl.
*A61K 38/17*(2006.01)
*A61K 48/00*(2006.01)

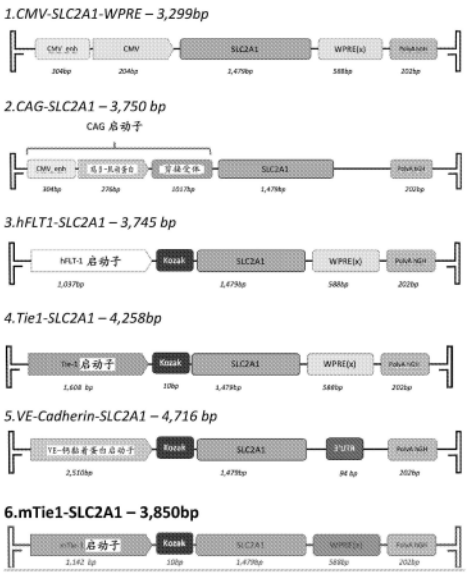
权利要求书3页 说明书51页
序列表（电子公布） 附图20页

(54)发明名称

用于表达GLUT1的腺相关病毒载体及其应用

(57)摘要

本公开提供了使用重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒作为载体表达GLUT1蛋白或其功能变体对GLUT1缺乏综合征及其相关失调进行的基因治疗。衣壳可以是AAV-BR1衣壳或其功能变体。也可以使用其他启动子或衣壳。所述rAAV病毒颗粒可以使用内皮细胞特异性启动子,例如FLT-1启动子。进一步地提供了治疗方法,如通过脑内和/或静脉内施用所述rAAV病毒颗粒,以及其他组合物和方法。




CN 118843473 A

1.一种重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒,其包含载体基因组和衣壳,

其中所述载体基因组包含表达盒,其两侧有5'和3'反向末端重复序列(ITR),

其中所述表达盒包含编码GLUT1或其功能变体的多核苷酸序列,与启动子操作性连接,以及

其中所述衣壳是BR1衣壳或其功能变体。

2.根据权利要求1所述的rAAV病毒颗粒,其中所述衣壳是BR1衣壳。

3.根据权利要求1所述的rAAV病毒颗粒,其中所述衣壳包含多肽序列基序XDGXXWX,其中每个X是任何氨基酸(SEQ ID NO:107)。

4.根据权利要求1所述的rAAV病毒颗粒,其中所述衣壳包含多肽序列ADGVQWT(SEQ ID NO:108)、DDGVSWK(SEQ ID NO:109)、SDGLTWS(SEQ ID NO:110)或SDGLAWV(SEQ ID NO:111)。

5.根据权利要求1所述的rAAV病毒颗粒,其中所述衣壳包含多肽序列NRGTEWD或者具有1、2、3个或更多个取代的功能变体。

6.根据权利要求1所述的rAAV病毒颗粒,其中所述衣壳包含多肽序列NRGTEWD(SEQ ID NO:112)。

7.根据权利要求1所述的rAAV病毒颗粒,其中与SEQ ID NO:76中所述的AAV2 VP1参考序列相比,所述衣壳包含在GH环中的多肽序列NRGTEWD的插入。

8.根据权利要求1所述的rAAV病毒颗粒,其中所述衣壳包含与SEQ ID NO:106中所述的AAV-BR1 VP3多肽序列共享至少98%、至少99%或100%同一性的VP3多肽。

9.根据权利要求1所述的rAAV病毒颗粒,其中所述衣壳包含与SEQ ID NO:105中所述的AAV-BR1 VP2多肽序列共享至少98%、至少99%或100%同一性的VP2多肽。

10.根据权利要求1所述的rAAV病毒颗粒,其中所述衣壳包含与SEQ ID NO:104中所述的AAV-BR1 VP1多肽序列共享至少98%、至少99%或100%同一性的VP1多肽。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的rAAV病毒颗粒,其中所述启动子是FLT-1启动子。

12.根据权利要求11所述的rAAV病毒颗粒,其中所述FLT-1启动子是人类FLT-1(hFLT-1)启动子。

13.根据权利要求12所述的rAAV病毒颗粒,其中所述hFLT-1启动子与SEQ ID NO:1共享至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的rAAV病毒颗粒,其中所述表达盒包含polyA信号,任选地人类生长激素(hGH)polyA。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的rAAV病毒颗粒,其中所述表达盒包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE),任选地WPRE(x)。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的rAAV病毒颗粒,其中所述表达盒包含3'非翻译区(3'UTR),该区域包含与SEQ ID NO:4共享至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性的序列。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的rAAV病毒颗粒,其中所述编码GLUT1的多核苷酸序列是SLC2A1多核苷酸。

18.根据权利要求17所述的rAAV病毒颗粒,其中所述SLC2A1多核苷酸是人类SLC2A1多核苷酸。

19.根据权利要求16至18中任一项所述的rAAV病毒颗粒,其中所述编码GLUT1的多核苷酸序列与SEQ ID NO:5共享至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的rAAV病毒颗粒,其中所述表达盒的侧翼有5'和3'反向末端重复序列(ITR),任选地AAV2ITR,任选地与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7共享至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的ITR。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的rAAV病毒颗粒,其中所述表达盒与SEQ ID NOs:8-16、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:101中的任一项共享至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性。

22.根据权利要求20或21所述的rAAV病毒颗粒,其中所述rAAV病毒颗粒不是AAV2病毒颗粒。

23.一种用于治疗和/或预防有需要的受试者中的疾病或失调的方法,包括向所述受试者施用权利要求19至22中任一项所述的rAAV病毒颗粒。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述疾病或失调是神经系统失调。

25.根据权利要求23或24所述的方法,其中所述疾病或失调是葡萄糖转运蛋白1缺乏综合征(GLUT1DS)或De Vivo疾病。

26.根据权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述rAAV病毒颗粒通过脑室内(ICV)注射施用。

27.根据权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述rAAV病毒颗粒通过静脉内(IV)注射施用。

28.根据权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述rAAV病毒颗粒通过脑室内(ICV)注射结合静脉内(IV)注射施用。

29.根据权利要求23至28中任一项所述的方法,其中所述施用导致编码GLUT1的多核苷酸序列在脑内的表达,任选地,与参考rAAV病毒颗粒相比以增加的水平表达。

30.根据权利要求23至29中任一项所述的方法,其中所述施用导致脑内GLUT1蛋白的表达增加和/或CSF中葡萄糖水平和/或乳酸水平增加,任选地,与参考rAAV病毒颗粒相比水平增加,其中所述增加任选地是增加至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或100%。

31.根据权利要求30所述的方法,其中所述参考rAAV病毒颗粒是AAV2病毒颗粒。

32.根据权利要求30所述的方法,其中所述参考rAAV病毒颗粒是AAV9病毒颗粒。

33.根据权利要求23至32中任一项所述的方法,其中所述rAAV病毒颗粒以$1\times10^{12}$载体基因组(vg)、$1\times10^{13}$vg、$1\times10^{14}$vg或$3\times10^{14}$vg的剂量施用。

34.根据权利要求23至33中任一项所述的方法,其中所述方法导致与使用内源Glut1启动子或遍在启动子进行的方法相比脑微血管内皮细胞的葡萄糖摄取增加。

35.一种在细胞中表达GLUT1的方法,包括将所述细胞与权利要求23至34中任一项所述

的rAAV病毒颗粒接触。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述细胞是内皮细胞。

37.根据权利要求36所述的方法,其中所述内皮细胞是脑微血管内皮细胞。

38.根据权利要求36或37所述的方法,其中所述内皮细胞是体内内皮细胞。

39.根据权利要求35所述的方法,其中所述细胞是神经元。

40.根据权利要求39所述的方法,其中所述神经元是体内神经元。

41.根据权利要求35至40中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述rAAV病毒颗粒体内施用于受试者。

42.根据权利要求35至41中任一项所述的方法,其中所述rAAV病毒颗粒导致所述细胞与接触含有内源Glut1启动子或遍在启动子的rAAV病毒颗粒的细胞相比其葡萄糖摄取增加。

43.一种药物组合物,其中包含权利要求23至34中任一项所述的rAAV病毒颗粒。

44.一种试剂盒,其中包含权利要求23至34中任一项所述的rAAV病毒颗粒或者权利要求43所述的药物组合物,任选地包含使用说明书。

# 用于表达GLUT1的腺相关病毒载体及其应用

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2022年2月8日提交的美国临时专利申请第63/307,963号的优先权,该申请的全部内容通过引用并入本文用于所有目的。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 以XML文件格式提供与本申请相关的序列表XML,其内容通过引用并入说明书中。包含序列表XML的XML文件名称是ROPA_027_01WO_ST26.xml。该XML文件为223m012字节,创建于2023年2月8日,通过美国专利商标局专利中心以电子方式提交。

## 背景技术

[0005] 编码葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)的SLC2A1基因中的突变与被称为GLUT1缺乏综合征(GLUT1 DS)的神经发育失调有关。GLUT1DS是一种常染色体显性失调,通常表现为散发病,具有新发突变,导致单倍性不足并引起症状性的杂合性。

[0006] GLUT1是不依赖胰岛素的葡萄糖转运蛋白。患有典型GLUT1 DS的患者,也称为De Vivo病,其脑内葡萄糖水平低,并表现出具有以下特征的表型:早期发作的癫痫(中位数12个月)、发育迟缓、获得性小头畸形(头部生长减速)、复杂运动障碍(痉挛、共济失调、肌张力障碍);阵发性眼头运动;以及脑脊液糖分过少,或脑脊液(CSF)中葡萄糖浓度低。此疾病的临床过程揭示了早期治疗的重要性。Alter等人,J.Child Neurol.30(2):160-169(2015年)。已发现GLUT1参与内皮细胞的功能,包括葡萄糖穿过血脑屏障(BBB)的转运、血管发生和BBB的维持。然而,关于GLUT1在维持BBB物理完整性方面的作用,在单倍性不足的小鼠模型中的研究提供了相互矛盾的证据。尽管GLUT1的内皮细胞谱系特异性敲除减少了内皮细胞的能量可用性,并且减少了增殖而不影响迁移,从而延迟了发育性血管发生(Veys等人,Circ.Res.2020;127:466-482),但尚未测试在内皮细胞中特异性恢复GLUT1表达的效果。

[0007] Tang等人,Ann.Clin.Trans.Neurol.2019;6(9):1923-1932中回顾了这种疾病的治疗策略。目前的治疗标准是生酮饮食,其提高血液中酮体的水平,这些酮体替代葡萄糖,使其可供脑使用。使用甘油三酯三庚酸甘油酯(Triheptanoin)的治疗已被推荐作为生酮饮食的替代方法。也尝试了使用腺相关病毒(AAV)载体的基因疗法。针对神经元中GLUT1缺乏,已经在新生小鼠模型中测试了在神经元特异性启动子(例如,突触蛋白)控制下编码GLUT1的AAV9载体。其他研究使用了组成型启动子(例如,CMV启动子)或内源性GLUT1基因的启动子。还测试了各种小分子,包括抗惊厥药碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺等。

[0008] 尽管GLUT1的单倍性不足会抑制脑血管发生,导致相对较小的脑微血管,这可能与内皮顶端细胞的葡萄糖依赖性有关,但Tang等人观察到,内皮细胞中的低GLUT1是否引发这种病理还有待研究。GLUT1蛋白在脑的其他细胞中也有表达,包括少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜细胞。

[0009] 对于GLUT1缺乏综合征的治疗的需求尚未得到满足。本文提供的基因疗法可解决这类需求。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明总体上涉及基于使用腺相关病毒(AAV)递送编码GLUT1的多核苷酸或其功能变体的基因疗法治疗神经系统疾病或失调。

[0012] 尽管GLUT1缺乏综合征(DS)是神经发育失调,临床表现源于缺乏适当的神经元功能,但目前的基因疗法可能(不受理论限制)靶向于负责引导中枢神经系统(CNS)中血管系统发生和发育的内皮细胞。通过静脉内、直接递送到脑室内系统或两者结合的途径向发育中的中枢神经系统CNS血管系统递送AAV,随后在内皮顶端细胞中表达GLUT1蛋白,可能在血管发生和神经发育的关键窗口期间促进整个CNS的血管生长和形成。此外,向CNS血管系统递送AAV,随后在成熟的内皮细胞中表达GLUT1蛋白,可能通过增加葡萄糖穿过血脑屏障的转运,促进神经元的葡萄糖可用性增加。

[0013] 在一个方面,本发明提供了一种重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒,其包含载体基因组和衣壳,其中所述载体基因组包含表达盒,其两侧有5'和3'反向末端重复序列(ITR),其中所述表达盒包含编码GLUT1或其功能变体的多核苷酸序列,与启动子操作性连接,并且其中所述衣壳是BR1衣壳或其功能变体。

[0014] 在一些实施方案中,所述衣壳是BR1衣壳。

[0015] 在一些实施方案中,所述衣壳包含多肽序列基序XDGXXWX,其中每个X是任何氨基酸(SEQ ID NO:107)。

[0016] 在一些实施方案中,其中所述衣壳包含多肽序列ADGVQWT(SEQ ID NO:108)、DDGVSWK(SEQ ID NO:109)、SDGLTWS(SEQ ID NO:110)或SDGLAWV(SEQ ID NO:111)。

[0017] 在一些实施方案中,所述衣壳包含多肽序列NRGTEWD或其具有1、2、3个或更多个取代的功能变体。

[0018] 在一些实施方案中,所述衣壳包含多肽序列NRGTEWD(SEQ ID NO:112)。

[0019] 在一些实施方案中,与SEQ ID NO:76中所述的AAV2 VP1参考序列相比,所述衣壳在GH环中包含多肽序列NRGTEWD的插入。

[0020] 在一些实施方案中,所述衣壳包含与SEQ ID NO:106中所述的AAV2 VP3多肽序列共享至少98%、至少99%或100%同一性的VP3多肽。

[0021] 在一些实施方案中,所述衣壳包含与SEQ ID NO:105中所述的AAV2 VP2多肽序列共享至少98%、至少99%或100%同一性的VP2多肽。

[0022] 在一些实施方案中,所述衣壳包含与SEQ ID NO:104中所述的AAV2 VP1多肽序列共享至少98%、至少99%或100%同一性的VP1多肽。

[0023] 在一些实施方案中,所述启动子是FLT-1启动子。

[0024] 在一些实施方案中,所述FLT-1启动子是人类FLT-1(hFLT-1)启动子。

[0025] 在一些实施方案中,所述hFLT-1启动子与SEQ ID NO:1共享至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性。

[0026] 在一些实施方案中,所述表达盒包含polyA信号,任选地人生长激素(hGH)polyA。

[0027] 在一些实施方案中,所述表达盒包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE),任选地WPRE(x)。

[0028] 在一些实施方案中,所述表达盒包含3'非翻译区(3'UTR),其包含与SEQ ID NO:4共享至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、

至少99％或100％同一性的序列。

[0029] 在一些实施方案中,所述编码GLUT1的多核苷酸序列是SLC2A1多核苷酸。

[0030] 在一些实施方案中,所述SLC2A1多核苷酸是人类SLC2A1多核苷酸。

[0031] 在一些实施方案中,所述编码GLUT1的多核苷酸序列与SEQ ID NO:5共享至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的同一性。

[0032] 在一些实施方案中,所述表达盒的侧翼有5'和3'反向末端重复序列(ITR),任选地AAV2 ITR,任选地与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7共享至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性的ITR。

[0033] 在一些实施方案中,所述表达盒与SEQ ID NOs:8-16、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:101中的任一项共享至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性。

[0034] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒不是AAV2病毒颗粒。

[0035] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗和/或预防有需要的受试者中的疾病或失调的方法,包括向所述受试者施用所述rAAV病毒颗粒。

[0036] 在一些实施方案中,所述疾病或失调是神经系统失调。

[0037] 在一些实施方案中,所述疾病或失调是葡萄糖转运蛋白1缺乏综合征(GLUT1DS)或De Vivo疾病。

[0038] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒通过脑室内(ICV)注射施用。

[0039] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒通过静脉内(IV)注射施用。

[0040] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒通过ICV注射结合IV注射施用。

[0041] 在一些实施方案中,所述施用导致编码GLUT1的多核苷酸序列在脑内的表达,任选地,与参考rAAV病毒颗粒相比以增加的水平表达。

[0042] 在一些实施方案中,所述施用导致脑内GLUT1蛋白的表达增加和/或CSF中葡萄糖水平和/或乳酸水平增加,任选地,与参考rAAV病毒颗粒相比水平增加,其中任选地所述增加是增加至少约10％、至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％或100％。

[0043] 在一些实施方案中,所述参考rAAV病毒颗粒是AAV2病毒颗粒的变体。

[0044] 在一些实施方案中,所述参考rAAV病毒颗粒是AAV-BV1病毒颗粒。

[0045] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒以$1\times10^{12}$个载体基因组(vg)、$1\times10^{13}$vg、$1\times10^{14}$vg或$3\times10^{14}$vg的剂量施用。

[0046] 在一些实施方案中,所述方法导致与使用内源Glut1启动子或遍在启动子进行的方法相比脑微血管内皮细胞的葡萄糖摄取增加。

[0047] 在一些实施方案中,本发明提供了一种在细胞中表达GLUT1的方法,包括将所述细胞与所述的rAAV病毒颗粒接触。

[0048] 在一些实施方案中,所述细胞是内皮细胞。

[0049] 在一些实施方案中,所述内皮细胞是脑微血管内皮细胞。

[0050] 在一些实施方案中,所述内皮细胞是体内内皮细胞。

[0051] 在一些实施方案中,所述细胞是神经元。

[0052] 在一些实施方案中,所述神经元是体内神经元。

[0053] 在一些实施方案中,所述方法包括将所述rAAV病毒颗粒体内施用于受试者。

[0054] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒导致所述细胞与接触含有内源Glut1启动子或遍在启动子的rAAV病毒颗粒的细胞相比其葡萄糖摄取增加。

[0055] 在一些实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,其中包含所述的rAAV病毒颗粒。

[0056] 在一些实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其中包含所述的rAAV病毒颗粒或者药物组合物,任选地包含使用说明书。

[0057] 在进一步的方面,本发明提供了多核苷酸(例如,载体基因组)、药物组合物、试剂盒以及其他组合物和方法。

[0058] 下文的详细描述中公开了各种其他的方面和实施方案。本发明仅受所附权利要求书的限制。

## 附图说明

[0059] 图1显示了各种非限制性实例的载体基因组的载体示意图。

[0060] 图2显示了一个非限制性实例的载体基因组的载体示意图。载体基因组的完整多核苷酸序列是SEQ ID NO:17。大写部分是表达盒(SEQ ID NO:8)。

[0061] 图3显示了一个非限制性实例的载体基因组的载体示意图。载体基因组的完整多核苷酸序列是SEQ ID NO:19。大写部分是表达盒(SEQ ID NO:10)。

[0062] 图4显示了一个非限制性实例的载体基因组的载体示意图。载体基因组的完整多核苷酸序列是SEQ ID NO:21。大写部分是表达盒(SEQ ID NO:12)。

[0063] 图5显示了一个非限制性实例的载体基因组的载体示意图。载体基因组的完整多核苷酸序列是SEQ ID NO:96。大写部分是表达盒(SEQ ID NO:97)。载体基因组的完整多核苷酸序列的另一实例是SEQ ID NO:23。表达盒的另一实例是SEQ ID NO:14。

[0064] 图6显示了一个非限制性实例的载体基因组的载体示意图。载体基因组的完整多核苷酸序列是SEQ ID NO:25。大写部分是表达盒(SEQ ID NO:16)。

[0065] 图7显示了一种非限制性实例的载体基因组的载体示意图。载体基因组的完整多核苷酸序列是SEQ ID NO:98。大写部分是表达盒(SEQ ID NO:99)。

[0066] 图8显示了一种非限制性实例的载体基因组的载体示意图。载体基因组的完整多核苷酸序列是SEQ ID NO:100。大写部分是表达盒(SEQ ID NO:101)。

[0067] 图9.AAV9介导的hGlut1蛋白在CHO-Lec2细胞中的表达。CHO-Lec2细胞被AAV9载体转导,所述AAV9载体在几种内皮细胞特异性启动子(即,hFLT1、mTie1或hGlut1)之一或遍在CMV启动子驱动下表达hGlut1转基因蛋白。[SLC2A1=GLUT1基因]。

[0068] 图10A-10C.转染人类脑微血管系统内皮细胞(hCMEC/d3s)后转基因蛋白(Glut1-GFP)的表达。

[0069] 图10A.转染含有几种内皮细胞启动子之一驱动Glut1-GFP转基因表达的构建体72小时后的GFP荧光。

[0070] 图10B.转染含有两种遍在启动子(CMV或CAG)之一的构建体、不含Glut1的对照载体(CMV-GFP)或未转染(No NFX)72小时后的GFP荧光。图像使用Operetta CLS™

(PerkinElmer®)获得。

[0071] 图10C.表达盒的示意图,所述表达盒含有感兴趣的启动子(hFLT1、mTie、hTie或hGlut1)和GLUT1(SLC2A1)基因(T2A连接的GFP)以及其侧翼有AAV2反向末端重复序列(ITR)的调控元件。

[0072] 图11A-11C.在表达人类GLUT1(SLC2A1)后,hCMEC/d3细胞中的2-脱氧-D-葡萄糖(葡萄糖)的摄取。向人类脑微血管内皮细胞(hCMEC/d3s)转染表达CAG-GFP的质粒(阴性对照)或在几种内皮细胞特异性启动子(即,hFLT1、mTie1或hGlut1)之一或在遍在CMV启动子驱动下的hGLUT1-t2A-eGFP转基因。使用基于发光的试剂盒(Promega®),采用培养基中的0.5mM 2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG)测量葡萄糖的摄取。通过相差显微镜成像,通过总细胞数将葡萄糖摄取标准化[误差棒代表S.E.M.;每种条件6个重复]。

[0073] 图11A.在第一次实验中,在转染后72小时测量葡萄糖(2-DG)摄取。

[0074] 图11B.在第二次实验中,在转染后72小时测量葡萄糖(2-DG)摄取。

[0075] 图11C.转染后96小时测量葡萄糖(2-DG)摄取。

[0076] 图12A-12B.在表达人类GLUT1(SLC2A1)后,hCMEC/d3细胞中的2-脱氧-D-葡萄糖(葡萄糖)摄取。向人类脑微血管内皮细胞(hCMEC/d3s)转染表达由几种内皮细胞特异性启动子(即,hFLT1、mTie1或hGlut1)之一或遍在CMV启动子驱动的hGLUT1-t2A-eGFP转基因的质粒。未转染的hCMEC/d3作为对照(CON)。采用培养基中不同浓度(0mM、0.1mM、0.5mM或1.0mM)的2-脱氧-D-葡萄糖,使用基于发光的试剂盒(Promega®)测量葡萄糖摄取。使用RealTime-Glo MT细胞活力检测试剂盒(Promega®)进行多重检测,对每个细胞的葡萄糖摄取进行标准化处理,按照制造商的建议进行。

[0077] 图12A.显示了表达人类Glut1(SLC2A1)后,在72小时时间点hCMEC/d3细胞的葡萄糖摄取。

[0078] 图12B.显示了表达人类Glut1(SLC2A1)后,在96小时时间点hCMEC/d3细胞的葡萄糖摄取。

[0079] 图13.在hCMEC/d3细胞中AAV9介导的hGLUT1(SLC2A1)表达后2-脱氧-D-葡萄糖(葡萄糖)的摄取。用表达CAG-GFP(阴性对照)或由几种内皮细胞特异性启动子(即,hFLT1、mTie1或hGlut1)之一或遍在CMV启动子驱动的hGLUT1转基因的AAV9载体(3x $10^5$个载体基因组/细胞)转导人类脑微血管内皮细胞(hCMEC/d3)。使用基于发光的Glucose Uptake-Glo试剂盒(Promega®)在转导后72小时测量葡萄糖(2-DG)摄取,并且使用RealTime-Glo MT细胞活力检测试剂盒(Promega®)按每个细胞标准化[误差棒代表S.E.M;每种条件4个重复]。

[0080] 发明详述

[0081] 本发明提供了GLUT1的基因治疗载体、使用方法以及其他组合物和方法,所述载体通过有内皮细胞嗜性的AAV病毒颗粒(如AAV-BR1)递送编码GLUT1或其功能变体的多核苷酸。在一些实施方案中,AAV载体基因组包括内皮细胞特异性启动子,如FLT-1启动子。

[0082] 本发明进一步提供了通过施用本发明的基因治疗载体来治疗受试者的疾病或失调的方法。在一些实施方案中,该疾病或失调是葡萄糖转运蛋白1缺乏综合征(GLUT1 DS)或De Vivo病。

[0083] 根据本发明,可以采用编码GLUT1或其功能变体的多核苷酸来生成基因治疗载体。所得载体可用于治疗疾病或失调,例如葡萄糖转运蛋白1缺乏综合征(GLUT1 DS)、De Vivo病或其他疾病。

[0084] 定义

[0085] 各节标题仅用于组织目的,不被理解为将所述的主题限定在特定方面或实施方案。

[0086] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属技术领域内普通技术人员通常理解的含义相同。与本文所述方法和材料类似或等效的方法和材料也可用于本发明的实践,下文将介绍一些合适的方法和材料。文中提到的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献的全部内容均以引用方式并入本文。如有冲突,以本说明书(包括定义)为准。此外,本文中描述的材料、方法和示例仅为说明性的,并不意图限定。

[0087] 本文提到的所有出版物和专利的全部内容均以引用方式并入本文,就如同每一篇单独的出版物或专利具体地、单独地指出通过引用并入一样。如有冲突,以本说明书(包括其中的任何定义)为准。然而,提及本文中引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利公开和专利申请并不是、也不应被理解为承认或任何形式的暗示它们构成有效的现有技术或构成世界上任何国家/地区的公知常识的一部分。

[0088] 在本说明书中,任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数值,并且在适当的情况下,包括其分数(例如,一个整数的十分之一和百分之一),除非另有说明。术语“大约”,当紧接在数字或数值之前时,指该数字或数字范围的正负10%。应该理解,术语“一个”和“一种”在此处使用时,除非另有说明,指的是列举的组分中的一项或多项。选项的使用(例如,“或”)应理解为指各选项中的任意一个、两者或任何组合。术语“和/或”应理解为指选项的任意一个或两者。如本文所用,术语“包括”和“包含”是同义的。

[0089] 术语“序列同一性”指的是感兴趣的多肽或多核苷酸序列与参考序列的同一性百分比,计算方式是将感兴趣序列与参考序列进行最优比对中精确匹配的数量的100倍除以参考序列的总长度(包括缺口)。可以使用欧洲分子生物学开放软件包(EMBOSS)的needle程序生成序列的最优比对,该程序可在www.ebi.ac.uk上找到,如Maderia等人在Nucleic Acids Res.47(W1):W636-W641(2019)中描述的。在比较DNA和RNA序列时,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)算作匹配。

[0090] 本文所用的“AAV载体”或“rAAV载体”指的是包含一个或多个感兴趣的多核苷酸(或转基因)的重组载体,这些多核苷酸(或转基因)的两侧有AAV反向末端重复序列(ITR)。当这些AAV载体存在于已经被编码并表达rep和cap基因产物的质粒转染的宿主细胞中时,这些AAV载体能够被复制并被包装成感染性病毒颗粒。或者,可以使用稳定工程化表达rep和cap基因的宿主细胞来包装AAV载体成感染性颗粒。

[0091] 本文所用的“AAV病毒颗粒”或“AAV病毒粒子”或“AAV载体颗粒”指的是由至少一种AAV衣壳蛋白和衣壳化的多核苷酸AAV载体组成的病毒颗粒。如本文所用,如果颗粒包含异源多核苷酸(即,不是野生型AAV基因组的多核苷酸,如要递送给哺乳动物细胞的转基因),它通常被称为“AAV载体颗粒”或简称为“AAV载体”。因此,AAV载体颗粒的生产必然包括AAV载体的生产,因为AAV载体颗粒中含有这样的载体。

[0092] 本文所用的“GH环”指的是AAV衣壳蛋白VP1的卷筒β-桶的G链和H链之间形成的环，如Xie等人，PNAS 99(16):10405-10410(2002年)中所描述的。

[0093] 本文所用的“启动子”指的是能够在真核细胞中促进从多核苷酸进行RNA转录起始的多核苷酸序列。

[0094] 本文所用的“载体基因组”指的是由载体(例如，rAAV病毒颗粒)包装的多核苷酸序列，包括侧翼序列(在AAV中，为反向末端重复序列)。“表达盒”和“多核苷酸盒”指的是位于侧翼ITR序列之间的载体基因组部分。“表达盒”指载体基因组包含与驱动表达的元件(例如，启动子)操作性连接的编码基因产物的至少一个基因。

[0095] 本文所用的术语“需要治疗的患者”或“需要治疗的受试者”指的是有风险或患有可以用本文公开的重组基因治疗载体或基因编辑系统治疗或改善的疾病、失调或状况的患者或受试者。需要治疗的患者或受试者例如可能是被诊断出患有与中枢神经系统相关的失调的患者或受试者。受试者可能在SLC2A1基因上有突变，或者缺失全部或部分SLC2A1基因或者基因调控序列，导致GLUT1蛋白异常表达。“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。根据本文描述的方法接受治疗的受试者可能是成人或儿童。受试者的年龄可能在一个范围内。

[0096] 本文所用的术语“变体”或“功能变体”可互换使用，指的是与亲代蛋白(parental protein)相比，具有一个或多个氨基酸取代、插入或缺失的蛋白质，其保留了亲代蛋白的一个或多个期望的活性。

[0097] 本文所用的“遗传破坏(genetic disruption)”指的是基因的功能部分或完全丧失或者活性异常。例如，受试者可能遭受SLC2A1基因的表达或功能的遗传破坏，导致受试者的至少某些细胞(例如，内皮细胞和/或神经元)中GLUT1蛋白的表达减少，或者功能丧失或异常。

[0098] 本文所用的“治疗”指的是改善疾病或失调的一个或多个症状。术语“预防”指的是延迟或中断疾病或失调的一个或多个症状的发作，或者延缓与SLC2A1相关的神经系统疾病或失调的进展，例如，GLUT1缺乏综合征(GLUT1 DS)。

[0099] GLUT1蛋白或多核苷酸

[0100] 本公开涉及与葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)蛋白相关的组合物和使用方法。已知SLC2A1的各种突变与GLUT1 DS相关。已观察到遗传突变和新发突变。在一些情况下，杂合的错义突变足以导致疾病。

[0101] GLUT1的多肽序列如下：

[0102] MEPSSKKLTGRLMLAVGGAVLGSLQFGYNTGVINAPQKVIEEFYNQTWVHRYGESILPTTLTTLWSLSVAIFSVGGMIGSFSVGLFVNRFGRRNSMLMMNLLAFVSAVLMGFSKLGKSFEMLILGRFIIGVYCGLTTGFVPMYVGEVSPTALRGALGTLHQLGIVVGILIAQVFGLDSIMGNKDLWPLLLSIIFIPALLQCIVLPFCPESPRFLLINRNEENRAKSVLKKLRGTADVTHDLQEMKEESRQMMREKKVTILELFRSPAYRQPILIAVVLQLSQQLSGINAVFYYSTSIFEKAGVQQPVYATIGSGIVNTAFTVVSLFVVERAGRRTLHLIGLAGMAGCAILMTIALALLEQLPWMSYLSIVAIFGFVAFFEVGPGPIPWFIVAELFSQGPRPAAIAVAGFSNWTSNFIVGMCFQYVEQLCGPYVFIIFTVLLV

[0103] LFFIFTYFKVPETKGRTFDEIASGFRQGGASQSDKTPEELFHPLG

[0104] ADSQV

[0105] (SEQ ID NO:26)。

[0106] 在一些实施方案中,GLUT1蛋白包含与SEQ ID NO:26至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽序列。

[0107] 在一些实施方案中,本公开提供了一种重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒,其包含衣壳和载体基因组,其中所述载体基因组包含编码GLUT1或其功能变体的多核苷酸序列,与启动子操作性连接。在一些实施方案中,本公开提供了一种重组腺相关病毒(rAAV)病毒颗粒,其包含衣壳和基因组,其中所述rAAV病毒颗粒基因组包含编码GLUT1蛋白的多核苷酸序列,其与启动子操作性连接。编码GLUT1蛋白的所述多核苷酸可以包含与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:

[0108] ATGGAGCCCAGCAGCAAGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCT

[0109] GGCCGTGGGAGGAGCAGTGCTTGGCTCCCTGCAGTTTGGCT

[0110] ACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCCAGAAGGTGATCGAG

[0111] GAGTTCTACAACCAGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAGAG

[0112] CATCCTGCCCACCACGCTCACCACGCTCTGGTCCCTCTCAGT

[0113] GGCCATCTTTTCTGTTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGT

[0114] GGGCCTTTTCGTTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTCAATGCT

[0115] GATGATGAACCTGCTGGCCTTCGTGTCCGCCGTGCTCATGGG

[0116] CTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGG

[0117] CCGCTTCATCATCGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTT

[0118] CGTGCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTCACCCACAGCCCTTCG

[0119] TGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCGTCG

[0120] GCATCCTCATCGCCCAGGTGTTCGGCCTGGACTCCATCATGG

[0121] GCAACAAGGACCTGTGGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCA

[0122] TCCCGGCCCTGCTGCAGTGCATCGTGCTGCCCTTCTGCCCCG

[0123] AGAGTCCCCGCTTCCTGCTCATCAACCGCAACGAGGAGAACC

[0124] GGGCCAAGAGTGTGCTAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTGAC

[0125] GTGACCCATGACCTGCAGGAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCA

[0126] GATGATGCGGGAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCTGTTCC

[0127] GCTCCCCCGCCTACCGCCAGCCCATCCTCATCGCTGTGGTGC

[0128] TGCAGCTGTCCCAGCAGCTGTCTGGCATCAACGCTGTCTTCT

[0129] ATTACTCCACGAGCATCTTCGAGAAGGCGGGGGTGCAGCAG

[0130] CCTGTGTATGCCACCATTGGCTCCGGTATCGTCAACACGGCC

[0131] TTCACTGTCGTGTCGCTGTTTGTGGTGGAGCGAGCAGGCCG

[0132] GCGGACCCTGCACCTCATAGGCCTCGCTGGCATGGCGGGTT

[0133] GTGCCATACTCATGACCATCGCGCTAGCACTGCTGGAGCAGC

[0134] TACCCTGGATGTCCTATCTGAGCATCGTGGCCATCTTTGGCT

[0135] TTGTGGCCTTCTTTGAAGTGGGTCCTGGCCCCATCCCATGGT

[0136] TCATCGTGGCTGAACTCTTCAGCCAGGGTCCACGTCCAGCTG

[0137] CCATTGCCGTTGCAGGCTTCTCCAACTGGACCTCAAATTTCA

[0138] TTGTGGGCATGTGCTTCCAGTATGTGGAGCAACTGTGTGGTC

[0139] CCTACGTCTTCATCATCTTCACTGTGCTCCTGGTTCTGTTCTT

[0140] CATCTTCACCTACTTCAAAGTTCCTGAGACTAAAGGCCGGAC

[0141] CTTCGATGAGATCGCTTCCGGCTTCCGGCAGGGGGGAGCCA

[0142] GCCAAAGTGACAAGACACCCGAGGAGCTGTTCCATCCCCTG

[0143] GGGGCTGATTCCCAAGTG

[0144] (SEQ ID NO:5)。

[0145] 在一些实施方案中,编码GLUT1蛋白的所述多核苷酸序列是密码子优化序列。编码GLUT1蛋白的所述多核苷酸可以包含与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:ATGGAACCATCATCCAAAAAGCTGACCGGACGACTGATGCTTGC
AGTTGGCGGTGCGGTCTTGGGGAGCCTGCAGTTTGGGTACAATACTGGCGTAATCAATGCCCCGCAGAAGGTTATTG
AAGAATTTTACAATCAAACGTGGGTACATCGCTACGGTGAATCCATTCTTCCTACAACTCTGACCACACTCTGGAGC
CTTTCTGTAGCGATTTTTTCCGTCGGGGGCATGATAGGATCATTTTCCGTCGGTCTTTTTGTGAACCGCTTTGGCCG
GAGAAATTCCATGCTGATGATGAATCTTCTCGCTTTCGTGAGTGCCGTCCTCATGGGATTTAGTAAACTGGGTAAAT
CTTTCGAGATGTTGATACTGGGGAGATTTATTATCGGCGTGTATTGTGGTTTGACCACGGGCTTTGTACCAATGTAT
GTTGGCGAGGTTTCTCCGACAGCATTGAGAGGTGCACTCGGGACCTTGCACCAGTTGGGCATCGTAGTAGGAATCCT
TATAGCGCAAGTTTTCGGGCTCGATTCCATCATGGGGAACAAAGATCTCTGGCCATTGCTCCTCTCAATAATTTTTA
TACCGGCATTGCTTCAGTGTATTGTTCTTCCTTTTTGCCCAGAGTCCCCTAGGTTCCTGCTCATAAACAGGAATGAG
GAGAATCGCGCTAAGTCCGTGTTGAAAAAACTTAGGGGAACTGCAGACGTTACTCACGATTTGCAAGAGATGAAGGA
GGAATCTAGGCAAATGATGCGCGAGAAGAAGGTTACCATACTCGAACTCTTCCGCTCCCCCGCGTACAGGCAGCCCA
TTCTTATCGCGGTCGTCTTGCAGTTGTCACAACAGTTGAGTGGGATTAATGCAGTTTTCTATTATAGCACGTCCATA
TTTGAAAAAGCAGGCGTCCAACAACCTGTCTATGCAACTATAGGCTCAGGCATTGTAAACACAGCGTTTACTGTAGT
ATCACTGTTTGTCGTTGAGCGGGCTGGTCGAAGGACCTTGCACCTCATAGGACTGGCGGGCATGGCGGGCTGTGCGA
TTCTTATGACAATTGCGCTCGCGCTGTTGGAACAGCTTCCGTGGATGTCCTATCTCTCTATAGTAGCAATATTTGGA
TTTGTTGCATTTTTTGAAGTTGGGCCCGGACCTATCCCCTGGTTCATCGTCGCGGAGCTCTTTTCCCAAGGCCCAAG
ACCGGCTGCCATTGCTGTTGCAGGCTTCTCAAACTGGACGAGTAATTTCATAGTAGGTATGTGTTTCCAGTATGTTG
AACAGCTCTGTGGGCCCTATGTCTTTATCATCTTTACTGTGTTGCTCGTGTTGTTCTTTATCTTCACTTATTTCAAA
GTACCCGAGACAAAGGGCAGGACGTTTGACGAGATTGCATCTGGTTTTAGACAAGGAGGTGCCTCACAGAGTGATAA
AACCCCGGAGGAATTGTTTCATCCGCTGGGAGCCGACTCACAGGTC

[0146] (SEQ ID NO:27)。

[0147] 任选地,编码AAV病毒颗粒基因组的所述多核苷酸序列可以包含Kozak序列,其包括但不限于GCCACCATGG(SEQ ID NO:28)。Kozak序列可能与编码GLUT1蛋白或其功能变体的多核苷酸序列重叠。例如,所述AAV病毒颗粒基因组可能包含与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列(带有下划线的是Kozak序列):gccaccATGGAGCCCAGCAGCAAGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCCGTGGGAGGAGCAGTGCTTGGC
TCCCTGCAGTTTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCCAGAAGGTGATCGAGGAGTTCTACAACCAGACATG

GGTCCACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCCACCACGCTCACCACGCTCTGGTCCCTCTCAGTGGCCATCTTTTCTG
TTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGTGGGCCTTTTCGTTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTCAATGCTGATGATG
AACCTGCTGGCCTTCGTGTCCGCCGTGCTCATGGGCTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGG
CCGCTTCATCATCGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTCACCCACAG
CCCTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCGTCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTCGGCCTG
GACTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGTGGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGCCCTGCTGCAGTGCAT
CGTGCTGCCCTTCTGCCCCGAGAGTCCCCGCTTCCTGCTCATCAACCGCAACGAGGAGAACCGGGCCAAGAGTGTGC
TAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTGACGTGACCCATGACCTGCAGGAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCAGATGATGCGG
GAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCTGTTCCGCTCCCCCGCCTACCGCCAGCCCATCCTCATCGCTGTGGTGCTGCA
GCTGTCCCAGCAGCTGTCTGGCATCAACGCTGTCTTCTATTACTCCACGAGCATCTTCGAGAAGGCGGGGGTGCAGC
AGCCTGTGTATGCCACCATTGGCTCCGGTATCGTCAACACGGCCTTCACTGTCGTGTCGCTGTTTGTGGTGGAGCGA
GCAGGCCGGCGGACCCTGCACCTCATAGGCCTCGCTGGCATGGCGGGTTGTGCCATACTCATGACCATCGCGCTAGC
ACTGCTGGAGCAGCTACCCTGGATGTCCTATCTGAGCATCGTGGCCATCTTTGGCTTTGTGGCCTTCTTTGAAGTGG
GTCCTGGCCCCATCCCATGGTTCATCGTGGCTGAACTCTTCAGCCAGGGTCCACGTCCAGCTGCCATTGCCGTTGCA
GGCTTCTCCAACTGGACCTCAAATTTCATTGTGGGCATGTGCTTCCAGTATGTGGAGCAACTGTGTGGTCCCTACGT
CTTCATCATCTTCACTGTGCTCCTGGTTCTGTTCTTCATCTTCACCTACTTCAAAGTTCCTGAGACTAAAGGCCGGA
CCTTCGATGAGATCGCTTCCGGCTTCCGGCAGGGGGGAGCCAGCCAAAGTGACAAGACACCCGAGGAGCTGTTCCAT
CCCCTGGGGGCTGATTCCCAAGTG

[0148] (SEQ ID NO:29)。

[0149] 在一些实施方案中,Kozak序列是含有或由以下任一项组成的替代的Kozak序列:

[0150] (gcc)gccRccAUGG(SEQ ID NO:30);

[0151] AGNNAUGN;

[0152] ANNAUGG;

[0153] ACCAUGG;和

[0154] GACACCAUGG(SEQ ID NO:31)。

[0155] 在一些实施方案中,所述AAV病毒颗粒基因组不包含Kozak序列。所述多核苷酸序列可能是密码子优化的。

[0156] AAV病毒颗粒基因组

[0157] 本公开的AAV病毒颗粒包含载体基因组。所述载体基因组可能包含表达盒(或者对于不需要表达所述多核苷酸序列的基因编辑应用,可以是多核苷酸盒)。可以使用任何合适的反向末端重复序列(ITR)。ITR可以来自与衣壳相同的血清型或不同的血清型(例如,可以使用AAV2 ITR)。

[0158] 在一些实施方案中,5'ITR包括与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:

[0159] TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC

[0160] GCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC

[0161] GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA

[0162] ACTCCATCACTAGGGGTTCCT

[0163] (SEQ ID NO:32)。

[0164] 在一些实施方案中,所述5'ITR包含与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:

[0165] GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCG

[0166] GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG

[0167] CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG

[0168] TTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACG

[0169] TA

[0170] (SEQ ID NO:6)。

[0171] 在一些实施方案中,所述5'ITR包含与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:

[0172] CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCC

[0173] CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCG

[0174] AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG

[0175] GGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCT

[0176] ACGTA

[0177] (SEQ ID NO:33)。

[0178] 在一些实施方案中,所述3'ITR包含与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:

[0179] AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG

[0180] CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA

[0181] CGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC

[0182] GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

[0183] (SEQ ID NO:34)。

[0184] 在一些实施方案中,所述3'ITR包含与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:

[0185] TACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAG

[0186] GAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCT

[0187] CGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACG

[0188] CCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC

[0189] GC

[0190] (SEQ ID NO:7)。

[0191] 在一些实施方案中,所述AAV病毒颗粒基因组包含一个或多个填充序列,例如,其与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性:GCGGCAATTCAGTC

GATAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGATTTAAATACGCGCTCTCTTAAGGTAGCCCCGGGACGCGTCAATTGACTACAAACCGAGTATCTGCAGAGGGCCCTGCGTATG

[0192] (SEQ ID NO:35);

[0193] CTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGATCCTCTCTTAAGGTAGCATCGAGATTTAAATTAGGGATAACAGGGTAATGGCGCGGGCCGC

[0194] (SEQ ID NO:36);或

[0195] GTTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACATTTCTGCTCACTGCAACCTCCTCCTCCCTGGGTTC

[0196] (SEQ ID NO:37)。

[0197] 启动子

[0198] 在一些实施方案中,编码GLUT1蛋白或其功能变体的多核苷酸序列与启动子操作性连接。

[0199] 本公开考虑使用各种启动子。在本公开的实施方案中有用的启动子包括但不限于,巨细胞病毒(CMV)启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子,或者含有CMV增强子和鸡β-肌动蛋白启动子片段及兔β-珠蛋白基因(CAG)的启动子序列。在一些情况下,所述启动子可能是合成启动子。Schlabach等人在PNAS USA.107(6):2538-43(2010年)中提供了示例性的合成启动子。在一些实施方案中,所述启动子包括与以下序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列:ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGG

[0200] (SEQ ID NO:38)。

[0201] 在一些实施方案中,编码GLUT1蛋白或其功能变体的多核苷酸序列与可诱导启动子操作性连接。可诱导启动子可以设置为响应于某种试剂的添加或积累,或者某种试剂的去除、降解或稀释而使所述多核苷酸序列转录表达或不转录表达。这种试剂可能是药物。这种试剂可能是四环素(tetracycline)或其衍生物之一,包括、但不限于多西环素(doxycycline)。在一些情况下,可诱导启动子是tet-on启动子、tet-off启动子、化学调控启动子、物理调控启动子(即,对光的存在或缺乏响应、或者对低温或高温响应的启动子)。可诱导启动子包括重金属离子诱导型启动子(如小鼠乳腺肿瘤病毒(mMTV)启动子或各种生长激素启动子),以及在T7 RNA聚合酶存在下有活性的来自T7噬菌体的启动子。这个可诱导启动子列表不是限制性的。

[0202] 在一些情况下,所述启动子是组织特异性启动子,例如能够在内皮细胞中比非内皮细胞中更大程度地驱动表达的启动子。在一些实施方案中,组织特异性启动子是内皮细胞特异性启动子。在一些实施方案中,组织特异性启动子是从各种内皮细胞特异性启动子中选择的,包括但不限于FLT1(血管内皮生长因子受体1)、Tie1(具有免疫球蛋白样和EGF样

结构域的酪氨酸激酶1)、VE-钙黏着蛋白(血管内皮钙黏着蛋白)、hSYN1(人突触蛋白)、INA(α-丝联蛋白)、NES(巢蛋白)、TH(酪氨酸羟化酶)、FOXA2(叉头框A2)、CaMKII(钙调蛋白依赖性蛋白激酶II)和NSE(神经元特异性烯醇化酶)。在一些情况下,所述启动子是遍在启动子。“遍在启动子”指的是在实验或临床条件下不是组织特异性的启动子。在一些情况下,所述遍在启动子是CMV、CAG、UBC、PGK、EF1-alpha、GAPDH、SV40、HBV、鸡β-肌动蛋白和人β-肌动蛋白启动子中的任何一个。

[0203] 在一些实施方案中,所述启动子序列选自表3。在一些实施方案中,所述启动子包含与SEQ ID NO:1-3和39-51中的任一个具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列。

[0204] 表3

[0205]

| 启动子 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| 人FLT-1(hFLT-1) | TTTGCTTCTAGGAAGCAGAAGACTGAGGAAATGACTTGGGCGGGTGCATCAATGCGGCCAAAAAAGACACGGACACGCTCCCCTGGGACCTGAGCTGGTTCGCAGTCTTCCCAAAGGTGCCAAGCAAGCGTCAGTTCCCCTCAGGCGCTCCAGGTTCAGTGCCTTGTGCCGAGGGTCTCCGGTGCCTTCCTAGACTTCTCGGGACAGTCTGAAGGGGTCAGGAGCGGCGGGACAGCGCGGGAAGAGCAGGCAAGGGGAGACAGCCGGACTGCGCCTCAGTCCTCCGTGCCAAGAACACCGTCGCGGAGGCGCGGCCAGCTTCCCTTGGATCGGACTTTCCGCCCCTAGGGCCAGGCGGCGGAGCTTCAGCCTTGTCCCTTCCCCAGTTTCGGGCGGCCCCCAGAGCTGAGTAAGCCGGGTGGAGGGAGTCTGCAAGGATTTCCTGAGCGCGATGGGCAGGAGGAGGGGCAAGGGCAAGAGGGCGCGGAGCAAAGACCCTGAACCTGCCGGGGCCGCGCTCCCGGGCCCGCGTCGCCAGCACCTCCCCACGCGCGCTCGGCCCCGGGCCACCCGCCCTCGTC | 1 |

[0206]

| | | |
|---|---|---|
| | GGCCCCCGCCCCTCTCCGTAGCCGCAGGGAAGCGAGCCT<br>GGGAGGAAGAAGAGGGTAGGTGGGGAGGCGGATGAGGG<br>GTGGGGGACCCCTTGACGTCACCAGAAGGAGGTGCCGG<br>GGTAGGAAGTGGGCTGGGGAAAGGTTATAAATCGCCCCC<br>GCCCTCGGCTGCTCTTCATCGAGGTCCGCGGGAGGCTCG<br>GAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTCCCCGG<br>CAGCGGCGGCGGCTCGGAGCGGGCTCCGGGGCTCGGGT<br>GCAGCGGCCAGCGGGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCG<br>GGGAAGTGGTTGTCTCCTGGCTGGAGCCGCGAGACGGG<br>CGCTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGCGGCGAACAAGAGGA<br>CGGACTCTGGCGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGGAGCGC<br>GGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTCGCGCTCACC | |
| 人 FLK-1 (hFLK-1) | TGGAGCCGCCAAATATTTTGGGAAATAGCGGGAATGTTG<br>GCGAACTGGGCAAGTGCGTTTTCTGATTAAGAGCAACCA<br>GATTCAGCTTTTTAAACTACAATTATACTGGCCAAACAAA<br>ATACCCTTATACAAAAACCAAAACTACTGGCAGGAGTCG<br>CTGCCAGCTTGCGACCCGGCATACTTGGCTGAGTATCCG<br>CTTCTCCCTTGTGGCTCCAAACTGCTGCAGATTCTCGGCC<br>ACTTCAGACGCGCGCGATGGCGAAGAGGGTCCTGCACTT<br>TGACGCGCCTGGTGAGGGAGCGCTGCTCTTCGCAGCGCT<br>CCTGGTGATGCTCCCCAAATTTCGGGGACCGGCAAGCGA<br>TTAAATCTTGGAGTTGCTCAGCGCCCGTTACCGAGTACTT<br>TTTATTTACACCAGAAACAAAGTTGTTGCTCTGGGATGTT<br>CTCTCCTGGGCGACTTGGGGCCCAGCGCAGTCCAGTTGT<br>GTGGGGAAATGGGGAGATGTAAATGGGCTTGGGGAGCT<br>GGAGATCGCCGCCGGGTACCCGGGTGAGGGGCGGGGCT<br>GGCCGCACGGGAGAGCCCCTCCTCCGCTCCGGCCCCGCC<br>CCGCATGGCCCCGCCTCCGCGCTCTAGAGTTTCGGCACC<br>AGCTCCCACCCTGCACTGAGTCCCGGGACCCCGGGAGAG<br>CGGTCAATGTGTGGTCGCTGCGTTTCCTCTGCCTGCGCC<br>GGGCATCACTTGCGCGCCGCAGAAAGTCCGTCTGGCAGC<br>CTGGATATCCTCTCCTACCGGCACCCGCAGACGCCCCTG<br>CAGCCGCGGTCGGCGCCCGGGCTCCCTAGCCCTGTGCGC<br>TCAACTGTCCTGCGCTGCGGGGTGCCGCGAGTTCCACCT<br>CCGCGCCTCCTTCTCTAGACAGGCGCTGGGAGAAAGAAC<br>CGGCTCCCGAGTTCTGGGCATTTCGCCCGGCTCGAGGTG<br>CA | 85 |
| 人 Tie-1 (hTIE-1 | AGCTCCTCCCAGCCTCAGGCCCAGGAATGGGAATCTCTG<br>TGGGTCACACATCAGTAGGGAGGTCTTTCCCGATCCTTTT | 2 |

[0207]

| | | |
|---|---|---|
| ) | CTATGCTACTCCAGGAGTCAAAGCGTCTCCTGGGACTTTT<br>CAGGGCGCTTCAGAAGAGCCCTGGGCCTAAACCAGCTCA<br>ACCAAGCTGCAGGGACCCAGCCTCCTGAGAAAAGTGAAT<br>GTGAGCCCGGTGCATTCAGAGGAGAATGAAGCCTTCACC<br>CAGAACACACTCTGGGAAGATGTCCCAGGCCCAGGGGGA<br>GGGTTTGTACTACCAGACCTAAGTCACCTAAACTGACAC<br>CAAGTCTCATCCATCCCAACCATTCCATTCCGGGTCAGAG<br>GGGTCATCGATTTAACCAGCAAGGCTGCCCATCCAACGG<br>TTGCTCCCTCTGCTCCCTGGAAGGGCCTCCTCGTGGGCG<br>TTCTGTACCTACAGGTCTTGTTCCGTTCTGGGAACTGCCA<br>GTGGTGGCAAGAGGTGGAGCAACGGGTGCCAGGGCAGG<br>GAGAGGTGAGTCTGGGAGGGAAGCAGAGGCAAGATCCA<br>TGGGGCTTTAGAGACTTTGCCAAAGCAGTGCGACTGCTC<br>CCAGGTTGTTGTCAGCCGTCAAGAGTGAGTGCACCTCCC<br>TGGGCAGACTTCTGCTGCCCCAGTGCCCAGGAATAGGCA<br>GGGGTTTGCCGCAAAATGAATGACACCTGGCAGACAATA<br>AGCTGAAGCTTTCATTAGCAGCTTAAGCTGAGGACTATCT<br>ATGCAACCGATACTCCCTGTGTGCTCCCCGGGACTGCTT<br>AATGTGAGCCCTTGTGGAGCGATTGGCACCAAGAAAGCA<br>AGGACTAAGTCAGAAGTTCAAGTCCCAGCCTTGCCACAG<br>CCTCAGGGTGCCCTCGAGCACAGCAAGCCTCAGTTTTCC<br>CATCTGTACAATGAGAGAGGTACACAAGGTAGACTCGAA<br>GGCTCTTTGTTGCCAGGGCCCTGTGTTCCTTTGAGTGTAT<br>GTGCTTCTCAGGCCCACAGAGGTCCTTTGTGTTTCGTATG<br>TGAACTGCTCTCTAGGAAACCCATGTAACTGTCTGTGTCC<br>TGGGGCACATACATGAGGACTCATGTGGGCCGTATTGTG<br>TGTTTGTGCCGGGGGGAGGGGAGACCCCAGAACAATGTC<br>CCCCACCCCACCCCCCTCCTCAATAGGCGGAAGCCACTG<br>GCTTCCTCCCTTTCCTGCCTCCTGCCTCCTTTGTGCCAGC<br>AAGACTGAGTACTGGAGAGAGACAGGGGATGGGAAAAAT<br>CAGTCCAGCTGTCCCCAGGTCTGCCCTTACCATAACCTTC<br>CCCCCACCTCAAGTGACTCCTCCCAGGCCACACCCATCC<br>CCAGCCTTGTGGGGGCCAGATTGGGGGGCCTAGAGGCTC<br>AAAGGCAGAATGAGTCCTCCCACCCCCTACCCTGCCACC<br>CCTCCCACCCAAGCCACCTCATTTCCTCTTCCTCCCCAGC<br>ACCGACCCACACTGACCAACACAGGCTGAGCAGTCAGGC<br>CCACAGCATCTGACCCCAGGCCCAGCTCGTCCTGGCTGG<br>CCTGGGTCGGCCTCTGGAGT | |
| 小 鼠 | AAGCTTCCGACCGTTAGTCAGAGAACTGTAAGTGCTCAG | 86 |

[0208]

| | | |
|---|---|---|
| Tie-1 (mTIE-1) | AGCCTGGCTGACAATGATCTGGAATGAACCAGATAACAA<br>CATAATAAAATCTCAGTAAAATAATTTAACAGTTAGCTTG<br>GAAGCTGGTCAGCTCTGGGGAAATCAGGGTAAATTGTGC<br>TGTCATGAACTGTCCCACACTGACATCGGCCAAAGTGAA<br>TATGAACTTTGGTAGATCCAATGCCTGTTCTATTTATTTT<br>TCCAGTGAAAAGTATTTTGATAGAGCTTTTCATTTTGTAA<br>ATACACTGAGTTAACCAAAATATCATGGATTTCCGTTTGT<br>TCTTAAGACATGCAACTCGTCTACGGCTATACCACTCTGA<br>ACGCGCCCGATCTCGGAAGACATGCAACTCAAATGTAAA<br>TACAGTAGAATATTACTTAGGTAGAAACTCCTGGTGATTT<br>TAAAAGATTGGAAAAGAATATGAGGAAGAGTTGAATAAT<br>GCAAATTCTAGTGTGTGTGCTACCGAAGTGAACACTTAAT<br>GCACAGTCTACAGACTAGGACATTTTATCGTGTGTTGTAA<br>AATTGGGTAGAAACTTGTGTTTGTGAAAACTGAGCATTAA<br>AACCTTACAGAGACCGTTTCTTGTTTACTTTTGAAAAAAA<br>AAAGAGTCACGTGAGCCTCATTTTGTATTTGTGTGTGTGT<br>GTGTGTGTGTGTCTCCCCTCCTCCCAGCGTGTGTGTGCT<br>GGGAGGAGGGGAGACCCCAGAACAATGTCCTGCCTCCAA<br>ACCTTCTCAATAGGCGGAAGCCACTGGCTTCCTCCCTTTC<br>CTGTCTCCCGTGCTCCAGCAATGCAGATGGAAGGGACCG<br>AAGGGATGGGAGAGAGAGCCCAACCATCCCCAGATCTGT<br>CCTTGTCACAACCTGCCTCCCACCTCTAATGCCCCCCCTT<br>CCAGAGACTTCCAGGCCACACCCATCCCGGGCTTGTGGG<br>GGCTGGACACGGGAGGACTACAGGCGACAACTCTTCCCA<br>CCCTCTCTCCCTGCCACCCCTCCTACCCTAACCATCATTT<br>CCTCTTCCTCCCCAGCACCGAGGTGCACTGAGCTGGACA<br>GGCTGAACACTCAGACCCACAGCAACTGACCCCGGGCCC<br>AGCTGGCCTTGGCTGGCCCAGGGCAGCTTCCAGAGT | |
| 人 Tie-2 (hTIE-2) | GCTGGAGTGCAGTGGCACGATCTCGGCTCACTGCAACCT<br>CTGCCTCCCAGGTTCAAACAATTCTCCTGCCTCAGCCTCC<br>AGAGTAGCTGGGGTTACAGGTGCACGCCAGCAAGCACAG<br>CTAAATTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTTGCCATG<br>TTGGCCAGGCTGGTCTCAAACTCCTGACCTCAGGTGATC<br>CACTCCCAAAGTGCTGGGATTATAGGCGTGAGCCACTGT<br>GCCAGGCCCACTGTTTTTGTTTTTTTTTTTCGTGATGACA<br>AATTTAAAGTCATCTCATAGGAATAGAAAATAGCTTTTTA<br>GTAGAAGCTCTTGGAATTTAAATTGAGACTGAATGGAAA<br>GATGAAAGAAAATAAACTTATTAACATTTAATGAGAACCT<br>TCAAAGAACTAGGCATAGTACCAAATGGTTTTATATTTTT | |

[0209]

AAACCTCATTTATTCCTCTCAAAACACCTGGGAAGGAGAT
ATTTTTGCCATTTCACAGCTGTTGAAACTGAGGCTCAAAA
AGACTAAGTAACTTTTCTCAGCTACACATGTGGCTGAGCC
AGTATTTGAACCCAGTTCTGTTTGCAGACAGAACCTGGG
CTTTTTCACACCTGCAAACTGGAAACATTAATTGGTTCTT
AAGATCATCATCGATGTGATAAAACCTGGGACAGAAATT
AGTCAAGACTAGCTGCATCTGCCTTTTCCTCTGGTGGGTA
GGAAAAGGAGGAGTATAATGATTTCCTCAGGCATGAAGG
TCGATGATGAGCAAAGTGTATACTCTCTAATCTAATGTCA
TAATTCATATTGTGGAGTAATTATCTGGATAAGTGTAGGG
TCTCTGACCTCATTCTAGATATTGTACATTCCATGGCTAT
TTTCATTTTGGTCCATGAACTCTCTTTGCTCTCATGAGCA
CCATTTTTATCCCAATCTAATCCTGTATGTTTGTGTTTTTA
CACAGATTAGTTTTTAAATGTTATATATAATTTGCTTCTG
AAACACCATTGCTCAATGACTACCAAATCTTTCTCATTAC
CAAAATCCTTCTATGCCAACTTCTTCAAGAAATTTGATCA
CCTTTAGATGAATTGTTAATGAAAATTAAAGCTATAGCCG
GCAACATGGGTATCTTTGGGCTAATGGCCAACCAACAGG
CCATCTGTGTGAAAGAAAACAGGCTAACAATTTTGGACT
CTGGTCTCTTGGGGCTACATTGAGCATTGACCTCACCGG
TGCTCACTGAAATTAATTGCTTTTCAGGTTGTATTTTCTC
ATCACGGAAACCTTCTTCTCCCAATTCAAACCATGTGGGT
TAAAATGAGAAAACAAAAGCCAAAACGGCTTCCCACACC
CAAAAGCTCCTTCTGTCAGAGATCCCAGTAGCCCCGGGA
GAGCTGTTAGAAGTCTGAGAAGGATTGGTCATCATCGCA
TACCATACATAGGTGGAGGGCTTGTTATTCTCAGTTTCCC
GCCTATGAGAGGATACCCCTATTGTTTCTGAAAATGCTGA
CCGGGACCCACACTTCCAACAAAAATTCCTCTGCCCCTAC
AGCAGCAGCAAAAGCAGCAGCAGAAGCAACAGCAACAGA
TAAGTGTTTTGATGAATTGCGAGATGGATAGGGCTTGAG
TGCCCCCAGCCCTGCTGATACCAAATGCCTTTAAGATACA
GCCTTTCCCATCCTAATCTACAAAGGAAACAGGAAAAAG
GAACTTAAAACTCCCTGTGCTCAGACAGAAATGAGACTG
TTACAGCCTGCTTCTGTGCTGTTCCTTCTTGCCTCTAACT
TGTAAACAAGACGTAGTAGGACGATGCTAATGGAAAGTC
ACAAACCGCTGGGTTTTTGAAAGGATCCTTGGGACCTCA
TGCACATTTGTGGAAACTGGATGGAGAGATTTGGGGAAG
CATGGACTCTTTAGCCAGCTTAGTTCTCTGTGGAGTCAGC
TTGCTCCTTTCTGGTAAGGTTTGGCTTTATTTTTTTTAATT

[0210]

| | | |
|---|---|---|
| | TAGTATTTTAAAAAACAGAGTTAGTGATTTCTGGGTGCTC<br>TCCCCAAATCTCATCAGTGCTGATGAACAAGGGGTGGCT<br>GTAGCAAAGGCACCATTTC | |
| 人 VE-钙黏着蛋白(hVE-cadherin) | CTAGTAGCAGAAACAAGGTCCTCTGGAAGAGCAACTGAT<br>GCTCTTAGGTACTGAAGCATCATCCTGCCCCAGAGACCA<br>CTCGCATATGAAGCACACATATTCAGTCTGCCTTACTTGT<br>GTTAATGATTGCCAGTGTCCCTCTGACCTCCTAGCCCTGA<br>AAAGTGTGGCCTGAAGGTCATTTCAGAGACGGGGAGAGC<br>TGCTCAGAGAAGCCAATCGGCGAGTCTAGGACACACAGA<br>CAGGATCTAGTCCCAGAGTTCGCTAGCCTAGGTGAGCGT<br>CCCCTGGCCCCTTATACCACTTCCTTCTCCAGCTTGCATC<br>TAATCTGCTCTGGCAGACCATCGTGTTTCCTGTCTTCCTG<br>GCAGCCTCCAGCACGCTCAGTGCTACTCCCTGCGCATGC<br>GCCCTCCTCCCAGTACCTTCTCTGACTCCAGTGGGCTTG<br>GAGTGCGAGGAGGAAGGGTGAGGAAGGGGTGAAATCAG<br>GTATTGGATCCACAGGGGGTCTGAAGAGCACTAGCCTGG<br>CCTTTTGGGACTGAACTTCTGCTATGAAGACCTCCACTGC<br>CATCCCTGGAGTCCGGGGCACATCCAAGGCTTGCTGTCC<br>ATCGTTTACTGTTTACAGATGACAACAATGACTGTGTTCG<br>GGGCAGAAATATCCACCAGGGCTAGAGTACAAAAGGAGT<br>TTGCATTGATGGCCGGACAGGCCCTGTCCCTGGCAGCCT<br>GCCAGCGCTGAGTATGAGACCCAGCGGGAAGTGCTACCC<br>TGGCAGACGTGTCCACTGAGTACACAGACCACCAAGGCA<br>GGCAGCTCTCGGGGAAGCTGTCTATGCTGGGCCAGCCCA<br>CCTTGAGGGCAGGGAACAGAACAGATTGTGGCAGAGAG<br>GAAAATGTGGAGCTTCTGTTTGTTCACAGACACACGCAC<br>TCGCCCACGCACGCACGCACGCACGCACGCACGCACGAA<br>TGCACGCACGCAGTAGTTGAATGCTATGGATTCCGCTCA<br>GAGCTGAGAACAGCCCCAGCGACAGTTCCCTGGCCTCTC<br>TCCTTACTCTGATGTCCTCATCTGTCTTCACATGGTCTCA<br>GGACGCTAATACTCCATCCTAATGTACACTCCTTTCCCTG<br>GGCCTCCGTTCCAGTTCAGTTCTCAGAGGACCTGGAGGG<br>AGTGATTGGCTACACCAACTTTGCTTTCGTTCACCAAGCC<br>CATGTCTCTACTTGGGTGTCTAATGGGCATCTCCAACATT<br>ACCTACCCCAAACAGAAAACCCTTTCTTCCCCCCAACCAC<br>ACCCCACCCTACCCCCACAGTATTTTCTCCATGCCCGGAA<br>AGATCTGCTCTCTTATGGTCCCTCTTTGCCTCACTGAAAA<br>GCAGGACAAGTTGGGGACTTCCCAAACTTTTATGCATGA<br>AGAAACCCAGGCAATTTGCCAAAAGGTACACTCTGGGGG | 3 |

[0211]

| | | |
|---|---|---|
| | TCTGTCATTTACTCTGAGCCAGAACCCTGAAATTTTTACT<br>AACCCATCACATAATGAATGAAGAGAATCTTTTTCTTTTT<br>TTTTTTTTTTCTTTTTTTTTGGTTTTTCGAGACAGGGTTTC<br>TCTGTATAGCCCTGGCTATCCTGGAACACACTCTGTAGAC<br>CAGGCTGGCCTCGAACTCAGAAATCCACCTGCCTCTGCC<br>TCCCGAGTGCTGGGATTAAAGGCGTGCGCCACCACGCCT<br>GGCTGAATGAAGAGAATCTTGACCTCATCTCCCCAGCCT<br>CTTGGTCCTGAGGGACCCTGGTCTACCTACTGCTTTGCT<br>GTCTTCTTAGCTCTTCTTACTTTTTTGCTGACTCAGACCT<br>ATGGCTATCTCCATTATACAGATGAGGAGACTGAGGCAT<br>GGATCCCTGGTTGGTCCATGGTCACGTGAAGCCCATCAC<br>CCAGTATTTGTAAAGTGAGATGGGCCAGGCTGGTACCTT<br>GGAACTGAAACTCACACTGCCCTACCTGGAAGAATCTGA<br>CAGGCAAAATCTGCTGCTGAAAGTGATTGTCTGTCACGT<br>TTCTCAGCTGCCCGACTCTGAGAACTCCACAGCCCCCTTT<br>CGTTCCACCATACTACAGAGTCGCCACGGAAAGCCGGCT<br>CTGTGGAGAAGCTGAGGTAGCTGGGTTTCTGTCTGGGTT<br>ACTCTGTCCAGCGAGGAAACAAGTACCTTAGACCCACTA<br>AGCCTCTGCTTTCTGAACTGTAAAGTGGGGGATATGACA<br>CCTGCCTCCCAGGGATGGCTGAATGCTCTGGCAGAAGCT<br>TAGAGCCCCCACAGCTACCCCTAGGCTCACAGCTCCTCC<br>GATGAGACCTAGAATTGAGGTATGAGTTGAATACCCCAG<br>GCAGGTCCAAGGCTTCCACGGGCCCAGGCTGACCAAGCT<br>GAGGCCGCCCACCGTAGGGCTTGCCTATCTGCAGGCAGC<br>TCACAAAGGAACAATAACAGGAAACCATCCCGAGGGGAA<br>GTGGGCCAGGGCCAGTTGGAAAACCTGCCTCCCTCCCAG<br>CCTGGGTGTGGCTCCCCTCTCCCCTCCTGAGGCAATCAA<br>CTGTGCTCTCCACAAAGCTCGGCCCTGGACAGACT | |
| 人 VE-钙黏着蛋白(hVE-cadherin)（简短版本） | CATCCATGCCCATGGCCTCAGATGCCAGCCATAAGCTGT<br>TGGGTTCCAAACCTCGACTCCAGGCTGGACTCACCCCTG<br>TCTCCCCCACCAGCCTGACACCTCCACCTGGGTATCTAAC<br>GAGCATCTCAAACTCAACCTGCCTGAGACAGAGGAATCA<br>CTATCCCCTCCTCCTCCAAAAATATCCTTCCATCACACTC<br>CCCATCTTGTGCTCTGATTTACTAAACGGCCCTGGGCCCT<br>CTCTTTCTCAGGGTCTCTGCTTGCCCAGCTATATAATAAA<br>ACAAGTTTGGGACTTCCCAACCATTCACCCATGGAAAAA<br>CAGAAGCAACTCTTCAAAGGACAGATTCCCAGGATCTGC<br>CCTGGGAGATTCCAAATCAGTTGATCTGGGGTGAGCCCA<br>GTCCTCTGTAGTTTTTAGAAGCTCCTCCTATGTCTCTCCT | 88 |

[0212]

| | | |
|---|---|---|
| | GGTCAGCAGAATCTTGGCCCCTCCCTTCCCCCCAGCCTC<br>TTGGTTCTTCTGGGCTCTGATCCAGCCTCAGCGTCACTGT<br>CTTCCACGCCCCTCTTTGATTCTCGTTTATGTCAAAAGCC<br>TTGTGAGGATGAGGCTGTGATTATCCCCATTTTACAGATG<br>AGGAAACTGTGGCTCCAGGATGACACAACTGGCCAGAGG<br>TCACATCAGAAGCAGAGCTGGGTCACTTGACTCCACCCA<br>ATATCCCTAAATGCAAACATCCCCTACAGACCGAGGCTG<br>GCACCTTAGAGCTGGAGTCCATGCCCGCTCTGACCAGGA<br>GAAGCCAACCTGGTCCTCCAGAGCCAAGAGCTTCTGTCC<br>CTTTCCCATCTCCTGAAGCCTCCCTGTCACCTTTAAAGTC<br>CATTCCCACAAAGACATCATGGGATCACCACAGAAAATC<br>AAGCTCTGGGGCTAGGCTGACCCCAGCTAGATTTTTGGC<br>TCTTTTATACCCCAGCTGGGTGGACAAGCACCTTAAACCC<br>GCTGAGCCTCAGCTTCCCGGGCTATAAAATGGGGGTGAT<br>GACACCTGCCTGTAGCATTCCAAGGAGGGTTAAATGTGA<br>TGCTGCAGCCAAGGGTCCCCACAGCCAGGCTCTTTGCAG<br>GTGCTGGGTTCAGAGTCCCAGAGCTGAGGCCGGGAGTAG<br>GGGTTCAAGTGGGGTGCCCCAGGCAGGGTCCAGTGCCA<br>GCCCTCTGTGGAGACAGCCATCCGGGGCCGAGGCAGCCG<br>CCCACCGCAGGGCCTGCCTATCTGCAGCCAGCCCAGCCC<br>TCACAAAGGAACAATAACAGGAAACCATCCCAGGGGGAA<br>GTGGGCCAGGGCCAGCTGGAAAACCTGAAGGGGAGGCA<br>GCCAGGCCTCCCTCGCCAGCGGGGTGTGGCTCCCCTCCA<br>AAGACGGTCGGCTGACAGGCTCCACAGAGCTCCACTCAC<br>GCTCAGCCCTGGACGGACAGGCAGTCCAACGGAACAGAA<br>ACATCCCTCAGCCCACAGGCACGGTGAGTGGGGGCTCCC<br>ACACTCCCCTCCACCCCAAACCCGCCACCCTGCGCCCAA<br>GATGGGAGGGTCCTCAGCTTCCCCATCTGTAGAATGGGC<br>ATCGTCCCACTCCCATGACAGAGAGGCTCC | |
| 人细胞间黏着分子 2 (hICAM-2) | GTCTCCCAGGCATGACTCCAACAATGCATCCCATGGGAT<br>TTGGGGTTCCCCAGATCTGGGGCTTGTAGGCCTGACTCT<br>CCCCTGTGCACACGTCTCATACACGCATGCGTGCACCCA<br>TTGCCTGCCCCGCCCCTTGCACAGGGAGTCAGCAGGGAG<br>GACTGGGTTATGCCCTGCTTATCAGCAGCTTCCCAGCTTC<br>CTCTGCCTGGATTCTTAGAGGCCTGGGGTCCTAGAACGA<br>GCTGGTGCACGTGGCTTCCCAAAGATCTCTCAGATAATG<br>AGAGGAAATGCAGTCATCAGTTTGCAGAAGGCTAGGGAT<br>TCTGGGCCATAGCTCAGACCTGCGCCCACCATCTCCCTC<br>CAGGCAGCCCTTGGCTGGTCCCTGCGAGCCCGTGGAGAC | 89 |

[0213]

| | | |
|---|---|---|
| | TGCCAGTC | |
| 人 Von Willebrand 因子 (hVWF) | ATCTTTAGCCGATCCATTCAACCCTGGCCAGGATCCAAAT GGACTGTTTTTGTCAGGGCCAGGACCGGATCCTTCATAC CTGGGGTGCATAGGAAGTGTTAGTACTCCCCTTCCTCCA AACACAGCAGCAAAATTGGCTCAGGTTGAGGTGTTTTTC TCAACTTCCCTGGAGTCCAGCCCTGGAAGCTGGATCAGG AAGCTGTGTTGTTCTACTGTGATTCCCCCTGGCCTGTATC AGCTTGCCCTGAAACAACCAGCATTCCTGGTTATCCCACA CAGGTGGGGCACTCTAGGAAGACCAGGGATCAAGTGTGG GGGTGTAGGGATAGGGGGTGTTTGGGGAGGGCAAGGCA GTTAATTAAGGCAGCTGCCAGGAGGTCTCCCTCCAAACT CTACAAAGCTTTATCAGCTTGGAGGTACTTCTAATACCAT TTCCTTTCATTGTTTCCTTTTGGTAATTAAAAGGAGGCCA ATCCCCTGTTGTGGCAGCTCACAGCTATTGTGGTGGGAA AGGGAGGGTGGTTGGTGGATGTCACAGCTTGGGCTTTAT CTCCCCCAGCAGTGGGGACTCCACAGCCCCTGGGCTACA TAACAGCAAGACAGTCCGGAGCTGTAGCAGACCTGATTG AGCCTTTGCAGCAGCTGAGAGCATGGCCTAGGGTGGGCG GCACCATTGTCCAGCAGCTGAGTTTCCCAGGGACCTTGG AGATAGCCGCAGCCCTCATTTGCAGGGGA | 90 |
| Ple261 (人密蛋白 5) | TGGCTTCCGGAGGGTGGCCTGGGGGCTGGGGTGCCAGG GACACCATCGCCACTGGTGGGAGGGCAGGGCACAGCCCC TCCGTGTCCCTTTGTCTCTCCTGTCTGAAGGCCAGAGCA GGCTGCTAGGCCTGGGGCCACCACTGCCCCTGGGTGCTA CACCCAGTGTGCTGGGTCACTGGGAACTTCCTGAAGTGG TGTCACCTGAACTGGGCCCCCAAGGATGGGGTGCGGGCA GTACCGCAGGAAGAGGAGCAGCCCCTGTGAAGATTGAGA GGTCTGGGAAGCCCCTGCGGCTTGGGAGAGTGGGGGTC GCCAGGCAGGGGGAAAGCCCCTGTGCCACCGCTTTTTGC CAGAGACTCAGGCTCCAGAGAGGCAGTGAGTGGCATGG GGGGTGAGGCTGGGGCCCTGGGCCTGACCTCCACACGC CTGCCTGGCCTCTCTGTTTGCCATGGGATGAGAGAGACA GTGCTGGGACTCAGAGCGGGGCTGGAGAGTGAGAGTGC GAGAAAGGGCCTGGGTGGGGCTTGGACCCCGGGGCGGG CTTTCTGGAGAGCCCCCCTACGAGGGCCTCTACGGCGGT GACGGGGTGGGGGGCTTCTGCAAACCTTGGTCAGGGAA GTGGAGCTGGCTCGAGTGGAAGAGACCACCCGGCTCAGT CGGGGATGTGGGAGTGGACTGGGTGGTGCAGACTGGGG GTCGAGCGCCTTCTGAAGTGACGGGGCCGGGACGCGCA | 91 |

[0214]

| | | |
|---|---|---|
| | GGGAGGCGGCCCAAGAAGCGCGCCCTAGGCCAGCCCAG<br>AATGCGCTCGGCCGCGACTAGGACAACGGCGGGTGGGG<br>CTGGGGGCGGCTGCCGGGCGGGGAGCGGTCCCGCGCCC<br>TCAGCTACCCCTCAAGAGCCGTTGTTTCCCTAACTTCAGC<br>TGCCAGAGGCTCTGTGATTGGCTGCGGCACGATGACCCG<br>CGCACGGATTGGCTGCTTCGGGCCGGGGGGCCGGGCCC<br>GGGGGACAGAATCCGCCCCCGAACCTTCAAAGAGGGTAC<br>CCCCCGGCAGGAGCTGGCAGACCCAGGAGGTGCGACAG<br>ACCCGCGGGGCAAACGGACTGGGGCCAAGAGCCGGGAG<br>CGCGGGCGCAAAGGCACCAGGGCCCGCCCAGGGCGCCG<br>CGCAGCACGGCCTTGG | |
| 人内皮糖蛋白(hENG) | CGCCTTGCTGTGCCACTTTGGGACTTCCCTCCCTAGCCTG<br>AGCTTCAGTTTTCCTGCCTGTTAGGCAGCCCCATGTCAAC<br>TGCACTTAGTAGGCCGGGTTTGATGCCCGACAAGACGTG<br>AAGTGGTGGAGGTGGGCAGGATCCCAGCGCTACCATCTT<br>CTTGAACCAGTGATCTCAACACATCGGATTTCTGTTTCCT<br>CATCTGCAAAATGGGATCAGTGAGCTCAGGTGGGTCACA<br>AATTCTACAGGAACTACTTTAGCCAAGCCCGGCCCCCTG<br>AAAGTTCCCCTCGGTGGGCTGTTAGGGTGATTGTTTTCAT<br>CTGTGGGGCTCCCTGATGCGTCCCACCCACCAGCCTTGG<br>AGAGGGTGGGATGGGAGGGTGGGGTGCTTGGGGAGACA<br>AGCCTAGAGCCTGGGCCCTCCCACCCCACTGCCTCCCCC<br>CATCCCAGGGCCCCCCACCCAGTGACAAAGCCCGTGGCA<br>CTTCCTCTACCCGGTTGGCAGGCGGCCTGGCCCAGCCCC<br>TTCTCTAAGGAAGCGCATTTCCTGCCTCCCTGGGCCGGC<br>CGGGCTGGATGAGCCGGGAGCTCCCTGCTGCCGGTCATA<br>CCACAGCCTTCATCTGCGCCCTGGGGCCAGGACTGCTGC<br>TGTCACTGCCATCCATTGGAGCCCAGCACCCCCTCCCCG<br>CCCATCCTTCGGACAGCAACTCCAGCCCAGCCCCGCGTC<br>CCTGTGTCCACTTCTCCTGACCCCTCGGCCGCCACCCCA<br>GAAGGCTGGAGCAGGGACGCCGTCGCTCCGGCCGCCTG<br>CTCCCCTCGGGTCCCCGTGCGAGCCCACGCCGGCCCCGG<br>TGCCCGCCCGCAGCCCTGCCACTGGACACAGGATAAGGC<br>CCAGCGCACAGGCCCCCACGTGGACACC | 92 |
| 人血小板衍生生长因子亚基B | GCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACAGTCACAACTCACTG<br>CAGCCTCAAACTCCTGGGCTCAAAACGATCCACAGTCTC<br>CTGAGTAGCTGGGACTACAGGAGCTTGTTACCACACCCA<br>GCTCCAGTTTATAAATTCATCTCCAGTTTATAAAGGAGGA<br>AACCGAGGTACTGAGAGGTTAAAAAACCTTCCTGCAGAC | 93 |

[0215]

| | | |
|---|---|---|
| (hPDGFB) | ACTTGTCCAGCAAGTGGCCACTCCAGGATTTGGACCAAG<br>GTGATGTGTCTTCAGGCTGTGTCTCTGCCACTGTGCCAC<br>GCTGCTGGGTGGTAGGCAGCAGTGGGTGGGTGCCTGCA<br>GTGGTCTGTAAAGACCACCTGAGATGTCCTTCCTCCTCTG<br>TTCCACCCTGTCCAGGTCCAAGAAGACAGTCTATGAAGA<br>GAGAGCAGGTGTGACTCTCTCAGTGTGCTCCTCTGTGAG<br>AAGCAGGCTGACATCCCAAAGGGAAGGGCGGATAACAGA<br>GACAGTGCAAGCGGAGGAGATGAGGGTGCCTCAAAGCC<br>GGGAGGCTGGGTGATGCAGGAGCCTGCGTGTCCCGAGG<br>GGGGTGCTGGGCCCAGTGTGAGTACGTGTGACTGTGACT<br>GAGACAGTGTGACTGCTGAAGGCAGGGACACAGCAGCTC<br>CCTGACTGGGGGCAGAAGGCGTTAACTGTGTGAAGGCTG<br>GTTGTGGGTGGGTGGGCTCTGGGCCTCGAACCCGGGGG<br>CTGAGGGAGATAGTAAACAGCAGGGTGACTGACGGGAA<br>GATCATGTTGGTAGCCCTGCGAAGATGCTGCAGGGCTGT<br>GGGGGTTTGTGTGACTTTGCAGTTCAACAAATTCAAATTC<br>AGCCAACGCTGGCAGGGCCTGTTGTGCCAGGCAACCAGC<br>TAGGAGGAGGAGACTCGGACCCAGCTTGCAGCTGAAGG<br>GCGCTGGCTGCCGGGTTCTGTGGGTTCACCTTGCGGTGT<br>CTTCCCTTGCTAACACTGAGTCCTTACAATAGCCCCATCT<br>CCAGGTTGAGGCTAGATGGAGGGGACAGAGGGAAGTGA<br>CTTGCCCAAGGTGACCCAAGCTCCCGAGTGCCAGGGCAG<br>GATCTGAATTCAGGCTCTCAGACTGCAGAGCCTGAGTCC<br>CTCCCTGCCATGCCTGTGCCAGGGTGGAAATGTCTGGTC<br>CTGGAGGGGAGCGTGGACTCCTGGCCTTGGCTCTGGAGA<br>CATCCCCCTAGACCACGTGGGCTCCTAACCTGTCCATGG<br>TCACTGTGCTGAGGGGCGGGACGGTGGGTCACCCCTAGT<br>TCTTTTTTCCCCAGGGCCAGATTCATGGACTGAAGGGTT<br>GCTCGGCTCTCAGAGACCCCCTAAGCGCCCCGCCCTGGC<br>CCCAAGCCCTCCCCCAGCTCCCGCGTCCCCCCCCTCCTG<br>GCGCTGACTCCGGGCCAGAAGAGGAAAGGCTGTCTCCAC<br>CCACCTCTCGCACTCTCCCTTCTCCTTTATAAAGGCCGGA<br>ACAGCTGAAAGGGTGGCAACTTCTCCTCCTGCAGCCGGG<br>AGCGGCCTGCCTGCCTCCCTGCGCACCCGCAGCCTCCCC<br>CGCTGCCTCCCTAGGGCTCCCCTCCGGCCGCCAGCGCCC<br>ATTTTTCATTCCCTAGATAGAGATACTTTGCGCGCACACA<br>CATACATACGCGCGCAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAG<br>CCCACCCTCCAGCCTCGCTGC | |
| 人内皮 | ACATCCAATGCCCGCTCTGCCTCATCTTCTATGGGAAACA | 94 |

[0216]

| | | |
|---|---|---|
| 细胞特异性分子 1 (hESM 1) | AGAATTTTAGAGGTCAGGTAGCCTAACACCATCAATTCTC<br>AAAAGAGGAAGCTGAGGCCAAGAGAAGTCCTGTGAATTT<br>CTTACAGCTCATTTGTGACAGACCAAGAATTACCCACTTT<br>ACTGGGTTGTTATTTACTAAGTGACAGTGAGTCTATATCT<br>CTTTTGACAAGTGAGGTGGGGGCATGGAATTCGGCATGT<br>GGTTGGTGTAAGAACTCCCCTCTCTCCTCTTTAACCTTAC<br>TTAATAAGACCCTGGCACAGTTGATATTTTAAGAGGGCTA<br>CTCTGTTTTCCCAGAGGGACCTAGGCACGGTAACCCTCT<br>TAGCATGCAGACCTTGTTTCCTGAGGGGTAATGTTTCCCT<br>TCCCTGTGACTTGTTTCTTGGGGGCTGTGTTCTGATTTTC<br>CTGCTGAGCCACTTGTTGCCTTGGGCTGGCTGCCGCGCT<br>TGGCAGTTTTTAGTGAGGGCTCTGATAGATGCCAGGAGG<br>TGAGGGGAAGGGCTCTGGGTGGACTCCGTCATTGGACAA<br>GCAGACTTAGTGATGGATGAGCCTTCCCCTGAGGAAGTT<br>TTGGATCAGAAGTCCAACTGATAAGTTTTTCCAGAATTGA<br>GTAACCCAGAAGCAGTGCCGAAAGGATCTTACCTCTCTT<br>GTGGCTTTTTGTATTGATTTTAAAAGAAATTCTCAGAGGC<br>AGTTCCACATTGTACTGGAAGCACAGCTATATCCACAATA<br>GGCTTAGATATATGTAACATGAATTGCTTTAGAAATAACA<br>TTTGAGGAGAGGGGTGAGAGGAAGGAAGAGAGGGTCTT<br>AAAAAATAGCCCTATCAAAATATTTTCTTTCTTCTAAGTA<br>TTGAAAAGACACAATATAACCCTTTCTTCTTTCAAATGAT<br>CTCATAGCTATTTGTTGAGGGGAAATACCAAATGTTTATT<br>ATTTTTTTTGAAGAAGCTTCTTCGGTCCTGATGATTCATG<br>TTGATATCATTTTCCTCCTGACTACAGAGGCTCTGAGACA<br>AAGCTACACCTCAAGTGATATGCCAGGGTCAGAACAATT<br>CCCGTCCTGAAGGAGGGTGTGCAACCTTCTTTATCCCTC<br>CTTCACAGACGTCCTTGAGCCCTTGAGACGGATGTGAGT<br>GAGTTTTTCAGTCCTCATGCAAAACAACCATCTAAACATA<br>ACAGATGACATCAGCTTGGGCTTTTCAATTCCTGGATGG<br>CAGCAGCGTGTTAATCCAGCCTTCATCCTGGATTTCATAA<br>ACCAAAACAAGAGAGCCTGGCAGGAGGACAGCGCTGCTG<br>CTGGGTTGAGGAAATTGATGACGGGAAAGCATGCGGGCA<br>ACCCAGTGTATAAAACTCATAAACGTGTAGGCAGAGGCT<br>CAGCTACCAGTTTGGACGGCTGCTTCCCACCAGCAAAGA<br>CCACGACTGGAGAGCCGAGCCGGAGGCAGCTGG | |
| 人 Apelin (hAPL | TGGCACACACGCACCCTGTCCAATGTATCTTTTGTGTAAA<br>TCTGGACTTAACACTTCAAGCAAACTGCCTGGCTTGCTGA<br>AAGGTGGAGACACCTTTCGATTCAGTCTTTTAATATGTGT | 95 |

[0217]

| | | |
|---|---|---|
| N) | TGAGTGCCACCTATGTGCAGAGCAAGATATTGGGGACTT<br>TGGAGAGATCCAGAAGAGTGAGAAGACAGTATCCTACCT<br>TAGGGGGTTCCCAGTCCAATGAGGGAAGCAGCCCCATGC<br>CTTGGGAGCTCCCAAGCTATAGAAGCAGCTAACAATCGA<br>GTCTGGAAAGGCAAACAACTTCAGGACCCGCTTCTAAAG<br>CGGAATCGCAAGTACACGCAAAATGAATCCAGCCTTGAC<br>TGTGTGGAGTTGGGTAAACCACCTGCCTCTTACGTTGAT<br>GGGGAACTAGAATGAGGACAGCTCCAGGGAACAAGAAAG<br>GGTAGACCATAGGAGCTGTCCCATGTCCCAACAGTGGGG<br>AGGAGCTGATGGGCGGCCCCTGCTGGATTAGTGTTATCC<br>TGAGAAGGCTTCTGGATGCGATGGGATTTGAGGTGCTGC<br>TGCAAAGAATGAATTGCTCACGGAAGGGTGGGGTGGGG<br>GCATTCCAGGTAGAGGGTGCCTCCTGGGGGATGCAGGGA<br>ACATGAGGGGCCTGGGCAATTAATCAAGCCTTGGGCACA<br>AGCCTAGGCAGTCACCCCCAATTCAAAGCCAGTTGAAAA<br>TGCAGAGGAGAGAGGAGGGCCAGTGTTTGGTTGTCTTGA<br>CCAAACCCTTGAAGCTGGCCAGCGGCAAGGGCAAGGACC<br>AGGGTCAGAGGTAGAGGGCGTGAGTGAAGGCAACCCAG<br>ACTGAGTCCTTCCCTAAGCGCCCAGGTTTCCTGACAGCT<br>GTTAAGGAAGCAAGGTGAGAAAGGGTTAAGTGTGCCCCT<br>CCACCGCCCCAAATGCTTCCTGTGTTTGAAATCCTTCAGG<br>TCTCTGCAAACCCTCTGGCCCCCGGCCAGGCGGGCATTG<br>TCCGGGGAGCGGTTGTAGGTTGTCAGAGAGGCCGCGCA<br>GCCTTTGTTGTGGGGCCACCTCGGGGTTCCCTCTCGCGC<br>TCACGCTCGGGCTGGGGCTGCAGAGTGCGTGCCTGGAG<br>GGGGGCGGTGCGGGAGGCTCGCTCCCTCTCCCTCTTCCT<br>GCCCCCCCTCTAGCCCTCCCGATGACCACATGACCAAGT<br>GGGCTCGCGGCCAAGCCACAAGCTACAAAATGCAGCCCC<br>TGGAGTGAGCGGGGAGCATTCTCTCTGGCAGCCGGGGTC<br>ACGGGCAGTTGCAGCCGCGGCCGAGCAGCCAGCCGCTAA<br>GAAAGAGCTCGCCGCTGCCGCTCCCGGAGCCGCCGAGGC<br>CAGCTTCGCGGCGCTGCCCCGCGGCGGGAGAGGAGGCT<br>GCAGAAGAGCGGAGGCGGCCAGCGG | |
| 人β-肌动蛋白(HuBa) | GCCCAGCACCCCAAGGCGGCCAACGCCAAAACTCTCCCT<br>CCTCCTCTTCCTCAATCTCGCTCTCGCTCTTTTTTTTTTC<br>GCAAAAGGAGGGGAGAGGGGGTAAAAAAATGCTGCACT<br>GTGCGGCGAAGCCGGTGAGTGAGCGGCGCGGGGCCAAT<br>CAGCGTGCGCCGTTCCGAAAGTTGCCTTTTATGGCTCGA<br>GCGGCCGCGGCGGCGCCCTATAAAACCCAGCGGCGCGA | 39 |

[0218]

| | | |
|---|---|---|
| | CGCGCCACCACCGCCGAGTC | |
| 鸡β-肌动蛋白(CBA) | GGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGA | 40 |
| 巨细胞病毒(CMV) | TGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG | 41 |
| 巨细胞病毒(CMV)(第二版) | TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGT | 42 |
| 巨细胞病毒(CMV)(第三版) | CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCA | 43 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGG<br>AGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAAT<br>GTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTA<br>GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT | |
| [0219] | CAG 启动子（第一版） | ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA<br>CCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATA<br>GTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG<br>GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAA<br>GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG<br>ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGA<br>CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT<br>AGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTT<br>CTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCA<br>ATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGAT<br>GGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGC<br>GGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGA<br>GGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAA<br>GTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTA<br>TAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGG | 44 |
| | CAG 启动子（第二版） | CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC<br>GCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTA<br>TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGT<br>CAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA<br>GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG<br>ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCC<br>AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT<br>CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGTCGAGGTGAGCC<br>CCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCC<br>ACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTG<br>CAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAG<br>GCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG<br>GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGC<br>TCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGC<br>GGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG | 45 |
| | 人 EF1-α (EF1-α) | CAACCTTTGGAGCTAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGAT<br>TCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCCGTCACCACCC<br>CCCCCAACCCGCCCCGACCGGAGCTGAGAGTAATTCATA<br>CAAAAGGACTCGCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGACC<br>GTCGTTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATCGCT | 46 |

[0220]

| | | |
|---|---|---|
| | GCGTTCCCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCATCACT<br>GAGGTGGAGAATAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTC<br>AGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGT<br>TGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGA<br>AGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAC<br>TGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTAT<br>ATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTT | |
| 人突触蛋白(Syn),简短版 | AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTG<br>GGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACA<br>AGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATC<br>AGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGT<br>GCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGC<br>CCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTG<br>AAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTC<br>CCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGCCG<br>GCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGGG<br>GGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGA<br>CTCAGCGCTGCCTC | 47 |
| 有3’延伸的人突触蛋白1(Syn) | AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTG<br>GGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACA<br>AGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATC<br>AGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGT<br>GCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGC<br>CCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTG<br>AAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTC<br>CCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGCCG<br>GCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGGG<br>GGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGA<br>CTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGT<br>CGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG | 48 |
| 有5’延伸的人突触蛋白(Syn) | CTGCAGAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAG<br>GACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGA<br>CCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCCATTC<br>CCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAA<br>ACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAG<br>CACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGC<br>GCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCAC<br>TCGCCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTG<br>GTCGCGTCCGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACC | 49 |

[0221]

| | | |
|---|---|---|
| | ACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCAT CTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTC | |
| 人 CamKIIa (CaMKIIa) | ACTTGTGGACAAAGTTTGCTCTATTCCACCTCCTCCAGGC CCTCCTTGGGTCCATCACCCCAGGGGTGCTGGGTCCATC CCACCCCCAGGCCCACACAGGCTTGCAGTATTGTGTGCG GTATGGTCAGGGCGTCCGAGAGCAGGTTTCGCAGTGGAA GGCAGGCAGGTGTTGGGGAGGCAGTTACCGGGGCAACG GGAACAGGGCGTTTTGGAGGTGGTTGCCATGGGGACCTG GATGCTGACGAAGGCTCGCGAGGCTGTGAGCAGCCACAG TGCCCTGC | 50 |
| eSYN 启动子 | GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTAC GGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGT TACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAA TGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACG TCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGCTGCAGAGGGCCC TGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGG CGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCA CTGGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCAT CCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCG AGGCGCGTCGCGACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGT GCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCT CAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCC GCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGC CGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCG AGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGC GCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGC GGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGG | 51 |
| hGLUT1 启动子 | ACCATTTTGCTAGAGAAGGCCGCGGAGGCTCAGAGAGGT GCGCACACTTGCCCTGAGTCACACAGCGAATGCCCTCCG CGGTCCCAACGCAGAGAGAACGAGCCGATCGGCAGCCTG AGCGAGGCAGTGGTTAGGGGGGGCCCCGGCCCCGGCCA CTCCCCTCACCCCCTCCCCGCAGAGCGCCGCCCAGGACA GGCTGGGCCCCAGGCCCCGCCCCGAGGTCCTGCCCACAC ACCCCTGACACACCGGCGTCGCCAGCCAATGGCCGGGGT | 102 |

[0222]

| | | |
|---|---|---|
| | CCTATAAACGCTACGGTCCGCGCGCTCTCT | |

[0223] 在一些实施方案中,所述AAV病毒颗粒基因组包含与SEQ ID NO:1具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少

97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。在一些实施方案中,所述AAV病毒颗粒基因组包含与SEQ ID NO:2具有至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。在一些实施方案中,所述AAV病毒颗粒基因组包含与SEQ ID NO:3具有至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％序列同一性的多核苷酸序列。

[0224] 启动子的其他说明性实例有来自猿猴病毒40的SV40晚期启动子、杆状病毒多角体增强子/启动子元件、单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV tk)、巨细胞病毒(CMV)的立即早期启动子以及包括LTR元件在内的各种反转录病毒启动子。许多其他启动子是在本领域已知且通常可用的,并且许多这类启动子的序列可在序列数据库中找到,如GenBank数据库。

[0225] 其他调控元件

[0226] 在一些情况下,本公开的AAV病毒颗粒进一步包含一个或多个选自下组的调控元件:增强子、内含子、poly-A信号、2A肽编码序列、WPRE(土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件)和HPRE(乙型肝炎转录后调控元件)。

[0227] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含CMV增强子。

[0228] 在一些特定实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含一个或多个增强子。在特别的实施方案中,增强子可以是CMV增强子序列、GAPDH增强子序列、β-肌动蛋白增强子序列或EF1-α增强子序列。上述序列在本领域中是已知的。例如,CMV立即早期(IE)增强子的序列是:

[0229] CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC

[0230] CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC

[0231] CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT

[0232] GGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT

[0233] GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG

[0234] TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG

[0235] GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC

[0236] TATTACCATG

[0237] (SEQ ID NO:52)。

[0238] 在一些特定实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含一个或多个内含子。在特别的实施方案中,所述内含子可以是兔珠蛋白内含子序列、鸡β-肌动蛋白内含子序列、合成内含子序列或EF1-α内含子序列。

[0239] 在特定实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含polyA序列。在特别的实施方案中,所述polyA序列可以是兔珠蛋白polyA序列、人生长激素polyA序列、牛生长激素polyA序列、PGK polyA序列、SV40 polyA序列或TK polyA序列。在一些实施方案中,所述polyA信号可以是牛生长激素聚腺苷酸化信号(bGHpA)。

[0240] 在特定实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含一个或多个转录稳定化元件。在特别的实施方案中,所述转录稳定化元件可以是WPRE序列、HPRE序列、支架附着区域、3'UTR或5'UTR。在特别的实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组同时包含5'UTR和3'UTR。

[0241] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含选自表4的5'非翻译区(UTR)。

在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含与SEQ ID NO:53-61中的任一个具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列。

[0242] 表4

[0243]

| 5′ 非翻译区 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| 人β-肌动蛋白外显子/内含子 | CGCGTCCGCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGAT<br>CCGCCGCCCGTCCACACCCGCCGCCAGGTAAGCCCGGCC<br>AGCCGACCGGGGCATGCGGCCGCGGCCCTTCGCCCGTGC<br>AGAGCCGCCGTCTGGGCCGCAGCGGGGGGCGCATGGGG<br>CGGAACCGGACCGCCGTGGGGGGCGCGGGAGAAGCCCC<br>TGGGCCTCCGGAGATGGGGGACACCCCACGCCAGTTCGC<br>AGGCGCGAGGCCGCGCTCGGGCGGGCGCGCTCCGGGGG<br>TGCCGCTCTCGGGGCGGGGGCAACCGGCGGGGTCTTTGT<br>CTGAGCCGGGCTCTTGCCAATGGGGATCGCACGGTGGGC<br>GCGGCGTAGCCCCCGTCAGGCCCGGTGGGGGCTGGGGC<br>GCCATGCGCGTGCGCGCTGGTCCTTTGGGCGCTAACTGC<br>GTGCGCGCTGGGAATTGGCGCTAATTGCGCGTGCGCGCT<br>GGGACTCAATGGCGCTAATCGCGCGTGCGTTCTGGGGCC<br>CGGGCGCTTGCGCCACTTCCTGCCCGAGCCGCTGGCGCC<br>CGAGGGTGTGGCCGCTGCGTGCGCGCGCGCGACCCGGT<br>CGCTGTTTGAACCGGGCGGAGGCGGGGCTGGCGCCCGG<br>TTGGGAGGGGGTTGGGGCCTGGCTTCCTGCCGCGCGCC<br>GCGGGGACGCCTCCGACCAGTGTTTGCCTTTTATGGTAA<br>TAACGCGGCCGGCCCGGCTTCCTTTGTCCCCAATCTGGG<br>CGCGCGCCGGCGCCCCCTGGCGGCCTAAGGACTCGGCG<br>CGCCGGAAGTGGCCAGGGCGGCAGCGGCTGCTCTTGGC<br>GGCCCCGAGGTGACTATAGCCTTCTTTTGTGTCTTGATAG<br>TTCGCCAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTT<br>TTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGT<br>CTCATCATTTTGGCAAAGAATTC | 53 |
| 鸡β-肌动蛋白外显子/内含子+兔珠蛋白内含子 | GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCC<br>GCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCG<br>TTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCT<br>CCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTT<br>CTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGG<br>AGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCG | 54 |

[0244]

| | | |
|---|---|---|
| | TGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCC<br>GCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGC<br>GGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCG<br>CGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGC<br>GAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGG<br>GGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGC<br>AACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACG<br>GCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGC<br>GCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGT<br>GGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGG<br>AGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCC<br>GGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTT<br>TTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTG<br>TCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGC<br>CGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGG<br>CGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTG<br>CGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTC<br>GGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGA<br>CGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGG<br>CGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTC<br>TTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGC<br>TGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTC | |
| 5′ UTR-Syn 1 Hs | AGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGA<br>GAGCGCAGCTGTGCTCCTGGGCACCGCGCAGTCCGCCCC<br>CGCGGCTCCTGGCCAGACCACCCCTAGGACCCCCTGCCC<br>CAAGTCGCA | 55 |
| CMV IE 外显子 | TCAGATCGCCTGGAGAGGCCATCCACGCTGTTTTGACCT<br>CCATAGTGGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCG<br>GGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAG<br>TGAC | 56 |
| TPL-eMLP (腺病毒衍生增强子元件) | CTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTG<br>TTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTC<br>CAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGG<br>TACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGAC<br>CGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACCAGTC<br>ACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGGCA<br>GCGGGTGGCGGTCGGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCTG<br>CTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGTCTTGAGACGGCGG<br>ATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTG | 57 |

[0245]

| | | |
|---|---|---|
| | TTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCATTACTTC<br>TGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAAACGAGGAGGATTT<br>GATATTCACCTGGCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGA<br>CAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCAC<br>TCCCAG | |
| 人 EF1-α 内含子/外显子 | CTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGT<br>GCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGT<br>TATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTCC<br>AGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTGGAGCCAGGGGCGG<br>GCCTTGCGCTTTAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGT<br>TGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAA<br>TCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA<br>GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACGTGCTGCGACG<br>CTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAGG<br>ATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGCCCGCGGCCG<br>GCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGA<br>GGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG<br>GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGC<br>CTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGG<br>CTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGG<br>CCGCTTCCCGGCCCTGCTCCAGGGGGCTCAAAATGGAGG<br>ACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCAC<br>ACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTC<br>ATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCT<br>CGATTAGTTCTGGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGT<br>TGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACT<br>GAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTG<br>ATGTAATTCTCCTTGGAATTTGGCCTTTTTGAGTTTGGAT<br>CTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT<br>TTTTCTTCCATTTCAG | 58 |
| 人 EF1-α, 内含子 A | GTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTT<br>ACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCT<br>GGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTG<br>GAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAG<br>CCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGC<br>GCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCG<br>CCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAA<br>TTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGAT<br>AGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATT | 59 |

[0246]

| | | |
|---|---|---|
| | TCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGC GTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAG CGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTG GCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTA TCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCAC CAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTG CTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGA GAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGC CTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG CTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTT TTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTG GAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCA AGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCA G | |
| 5’ UTR 人 CamKII a | TCAGAAGCCCCGGGCTCGTCAGTCAAACCGGTTCTCTGT TTGCACTCGGCAGCACGGGCAGGCAAGTGGTCCCTAGGT TCGGG | 60 |
| B-珠蛋白内含子 | GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTT TTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTA ACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCAT TTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTT TTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTT TCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCAC CATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCA ATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAAT TGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCT ACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGA TAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGC TAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCTCCCACAG | 61 |

[0247] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含从表5中选择的3’非翻译区。在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含与SEQ ID NO:62-70中的任一个具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列。

[0248] 表5

[0249]

| 3′ 非翻译区 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| WPRE(x)(突变的土拨鼠肝炎病毒调控元件 – 版本 1) | AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGAC<br>TGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTG<br>GATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCT<br>TCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCC<br>TGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGT<br>CAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGAC<br>GCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTC<br>AGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATT<br>GCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCT<br>GCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTC<br>CGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGC<br>TGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGAC<br>GTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGG<br>ACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCT<br>CTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGAT<br>CTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGC | 62 |
| WPRE(x)(突变的土拨鼠肝炎病毒调控元件 – 版本 2) | TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG<br>GTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGA<br>TACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTC<br>CCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCT<br>GGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTC<br>AGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACG<br>CAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCA<br>GCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTG<br>CCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTG<br>CTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCC<br>GTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCT<br>GCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACG<br>TCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGA<br>CCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTC<br>TTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATC<br>TCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCA | 63 |

[0250]

| | | |
|---|---|---|
| WPRE(x)(突变的土拨鼠肝炎病毒调控元件 – 版本 3) | TTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAA<br>AGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTAC<br>GCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG<br>CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGT<br>ATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGG<br>CCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGT<br>TTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCAC<br>CACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCC<br>TCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTT<br>GCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTG<br>ACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTT<br>CCGCGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGC<br>GCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAAT<br>CCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTC<br>TGCGGCCTCTTCCGCCTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACG<br>AGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCCATGTA<br>TCTTTTTCACCTGTGCCTTGTTTTTGCCTGTGTTCCGC<br>GTCCTACTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGCGG<br>CTTTGGGGCATGGACATAGATCCCTATAAAGAATTTGG<br>TTCATCTTATCAGTTGTTGAATTTTCTTCCTTTGGAC | 64 |
| CAAX | TGTGTGATAATG | 65 |
| EES | CTGTTCTCATCACATCATATCAAGGTTATATACCATCA<br>ATATTGCCACAGATGTTACTTAGCCTTTTAATATTTCTC<br>TAATTTAGTGTATATGCAATGATAGTTCTCTGATTTCT<br>GAGATTGAGTTTCTCATGTGTAATGATTATTTAGAGTT<br>TCTCTTTCATCTGTTCAAATTTTTGTCTAGTTTTATTTT<br>TTACTGATTTGTAAGACTTCTTTTTATAATCTGCATATT<br>ACAATTCTCTTTACTGGGGTGTTGCAAATATTTTCTGT<br>CATTCTATGGCCTGACTTTTCTTAATGGTTTTTTAATTT<br>TAAAAATAAGTCTTAATATTCATGCAATCTAATTAACA<br>ATCTTTTCTTTGTGGTTAGGACTTTGAGTCATAAGAAA<br>TTTTTCTCTACACTGAAGTCATGATGGCATGCTTCTAT<br>ATTATTTTCTAAAAGATTTAAAGTTTTGCCTTCTCCATT<br>TAGACTTATAATTCACTGGAATTTTTTTGTGTGTATGG<br>TATGACATATGGGTTCCCTTTTATTTTTTACATATAAAT<br>ATATTTCCCTGTTTTTCTAAAAAAGAAAAAGATCATCA<br>TTTTCCCATTGTAAAATGCCATATTTTTTTCATAGGTCA<br>CTTACATATATCAATGGGTCTGTTTCTGAGCTCTACTC<br>TATTTTATCAGCCTCACTGTCTATCCCCACACATCTCAT | 66 |

[0251]

| | | |
|---|---|---|
| | GCTTTGCTCTAAATCTTGATATTTAGTGGAACATTCTT TCCCATTTTGTTCTACAAGAATATTTTTGTTATTGTCTT TGGGCTTTCTATATACATTTTGAAATGAGGTTGACAAG TTA | |
| HPRE | ATAACAGGCCTATTGATTGGAAAGTTTGTCAACGAATT GTGGGTCTTTTGGGGTTTGCTGCCCCTTTTACGCAATG TGGATATCCTGCTTTAATGCCTTTATATGCATGTATAC AAGCAAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACTTACAAG GCCTTTCTCAGTAAACAGTATATGACCCTTTACCCCGT TGCTCGGCAACGGCCTGGTCTGTGCCAAGTGTTTGCT GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCATAGGCC ATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTCCTCTGCCG ATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTTTGCTCG CAGCAGGTCTGGAGCAAACCTCATCGGGACCGACAAT TCTGTCGTACTCTCCCGCAAGTATACATCGTTTCCATG GCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGG ACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGC GGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTGGGGCTCTACCGC CCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCGTCCGACCACGGGGC GCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCTTCT CATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCA CGTCGCATGGAGGCCACCGTGAACGCCCACCGGAACC TGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGGACTCTTGGACTTTCA GCAATGTCATC | 67 |
| R2V17 *(HepB 衍生的增强子元件)* | TTCCTGTAAACAGGCCTATTGATTGGAAAGTTTGTCAA CGAATTGTGGGTCTTTTGGGGTTTGCTGCCCCTTTTAC GCAATGTGGATATCCTGCTTTAATGCCTTTATATGCAT GTATACAAGCAAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACT TACAAGGCCTTTCTCAGTAAACAGTATATGACCCTTTA CCCCGTTGCTCGGCAACGGCCTGGTCTGTGCCAAGTG TTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCAT AGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTCCTC TGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTTT GCTCGCAGCTGGACTGGAGCAAACCTCATCGGGACCG ACAATTCTGTCGTACTCTCCCGCAAGCACTCACCGTTT CCGCGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGC GCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAAT CCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTC TGCGGCCTCTTCCGCCTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACG | 68 |

[0252]

| | | |
|---|---|---|
| | AGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCCATGTA TCTTTTTCACCTGTGCCTTGTTTTTGCCTGTGTTCCGC GTCCTACTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGCGG CTTTGGGGCATGGACATAGATCCCTATAAAGAATTTGG TTCATCTTATCAGTTGTTGAATTTTCTTCCTTTGGAC | |
| 3'UTR(珠蛋白) | GCTGGAGCCTCGGTAGCCGTTCCTCCTGCCCGCTGGG CCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCCTCCTTGCACCGGCCC TTCCTGGTCTTTGAATAAA | 69 |
| WPRE(r) | ATTCGAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTT CTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATA AAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGA TATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAA ACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTC CTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGA TTGACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCT GTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTA TTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTAT AAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCC CGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTG CTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCAC CTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCC CGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGC CCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGAT AATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGGGCC | 70 |

[0253] 在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含选自表6的多聚腺苷酸化(polyA)信号。在一些实施方案中,所述polyA信号包含与SEQ ID NO:71-75中的任一个具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列。

[0254] 表6

[0255]

| 聚腺苷酸化位点 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| 兔珠蛋白 | TGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGT | 71 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | (pAGlobin-Oc) | TGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGAACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATC | |
| | 牛生长激素(pAGH-Bt – 版本1) | TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAATACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTGGG | 72 |
| [0256] | 牛生长激素(pAGH-Bt – 版本2) | TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTGGG | 73 |
| | 牛生长激素(pAGH-Bt – 版本3) | CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG | 74 |
| | 人生长激素(pAGH-Hs) | CTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCCCAAGTTGGGAAGAAACCTGTAGGGCCTGC | 75 |

[0257] 图2-8中展示了说明性的rAAV病毒颗粒基因组,并以SEQ ID NOs:17-25的形式提供。每个序列的大写部分是表达盒(SEQ ID NOs:8-16,SEQ ID NO:97,SEQ ID NO:99,和SEQ ID NO:101)。在一些实施方案中,所述rAAV病毒颗粒基因组包含与SEQ ID NOs:8-16,SEQ ID NO:97,SEQ ID NO:99,和SEQ ID NO:101中的任一个具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多核苷酸序列、任选地带有或不带有由小写字母标出的ITR序列,基本上由其组成或者由其组成,。编码序列以下划线表示。表达盒以大写表示。

[0258] 腺相关病毒基因组

[0259] 腺相关病毒(AAV)是复制缺陷型细小病毒,其单链DNA基因组长度约为4.7kb,包含2个约145个核苷酸的反向末端重复序列(ITR)。已知AAV有多种变体,有时根据抗原表位分类也称为血清型。AAV各血清型的基因组的核苷酸序列是已知的。例如,AAV-1的完整基因组在GenBank登录号NC_002077中提供;AAV-2的完整基因组在GenBank登录号NC_001401和Srivastava等人,J.Virol.,45:555-564(1983年)中提供;AAV-3的完整基因组在GenBank登录号NC_1829中提供;AAV-4的完整基因组在GenBank登录号NC_001829中提供;AAV-5的基因组在GenBank登录号AF085716中提供;AAV-6的完整基因组在GenBank登录号NC_001862中提供;AAV-7和AAV-8基因组的部分序列分别在GenBank登录号AX753246和AX753249中提供;AAV-9的基因组在Gao等人,J.Virol.,78:6381-6388(2004年)中提供;AAV-10的基因组在Mol.Ther.,13(1):67-76(2006年)中提供;AAV-11的基因组在Virology,330(2):375-383(2004年)中提供。AAVrh.74基因组的序列在US专利9,434,928中提供,通过引用并入本文。AAV ITR中含有指导病毒DNA复制(rep)、衣壳化/包装和宿主细胞染色体整合的顺式作用序列。三个AAV启动子(根据它们的相对图谱位置命名为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),加上单个AAV内含子(在核苷酸2107和2227处)的差异剪接,导致从rep基因产生四种rep蛋白(rep78、rep68、rep52和rep40)。Rep蛋白具有多种酶促特征,它们最终负责复制病毒基因组。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产生这三种相关的衣壳蛋白。AAV基因组的图谱位置95处有单个共有聚腺苷酸化位点。Muzyczka,Current Topics in Microbiology and Immunology,158:97-129(1992年)中回顾了AAV的生命周期和遗传学。

[0260] AAV具有独特的特性,使其成为向细胞递送外来DNA的理想载体,例如,在基因治疗中。AAV对培养细胞的感染不会导致细胞病变,自然感染人类和其他动物也是沉默和无症状的。此外,AAV感染许多哺乳动物细胞,允许在体内靶向许多不同的组织。此外,AAV转导缓慢分裂和非分裂细胞,并且可以作为转录活跃的核型附加体(染色体外元件)在这些细胞中持续存在,基本上贯穿细胞的整个生命周期。AAV原病毒基因组作为克隆DNA插入质粒中,这使得重组基因组的构建成为可能。此外,由于AAV基因组的ITR中含有指导AAV复制和基因组衣壳化的信号,该基因组(编码复制和结构衣壳蛋白,rep-cap)的内部大约4.3kb的部分或全部可以被外来DNA替换。为了产生rAAV载体基因组,rep和cap蛋白可以反式形式提供。AAV的另一个显著特点是它是一种非常稳定和强健(hearty)的病毒。它容易承受用于灭活腺病毒的条件(56℃至65℃数小时),这使得AAV的冷藏保存不那么关键。AAV甚至可以冻干。最后,AAV感染的细胞对重复感染没有抵抗力。

[0261] 本发明实践中有用的重组AAV病毒颗粒可利用分子生物学领域众所周知的方法构建。通常,携带转基因的病毒载体是由编码转基因的多核苷酸、适当的调控元件以及生产病毒蛋白(介导细胞转导)所需的元件组装而成。这样的rAAV病毒颗粒可以通过本领域已知的技术生产,例如,通过转染包装细胞或通过与辅助质粒或病毒一起瞬时转染。病毒包装细胞的典型例子包括但不限于HeLa细胞、SF9细胞(任选地与杆状病毒辅助载体一起使用)、293细胞等。可以使用基于疱疹病毒的系统来生产AAV载体,如US20170218395A1中所述。可以在WO95/14785、WO96/22378、美国专利号5,882,877、美国专利号6,013,516、美国专利号4,

861,719、美国专利号5,278,056和WO94/19478中找到生产这种复制缺陷型重组病毒的详细实验方案,每个文件的全部内容通过引入并入本文。

[0262] 在本发明实践中有用的AAV载体可以使用各种系统包装成AAV病毒颗粒(病毒粒子),包括基于腺病毒的系统和无辅助系统。AAV生物学中的标准方法包括以下文件所描述的:Kwon和Schaffer,Pharm Res.25(3):489-99(2008年);Wu等人,Mol.Ther.14(3):316-27(2006年);Burger等人,Mol.Ther.10(2):302-17(2004年);Grimm等人,Curr Gene Ther.3(4):281-304(2003年);Deyle DR和Russell DW,Curr Opin Mol Ther.11(4):442-447(2009年);McCarty等人,Gene Ther.8(16):1248-54(2001年);以及Duan等人,Mol Ther.4(4):383-91(2001年)。无辅助系统包括在US 6,004,797;US 7,588,772和US 7,094,604中描述的那些。

[0263] rAAV载体基因组中的AAV DNA可以来自任何可以衍生出重组病毒的AAV变体或血清型,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAV13等AAV变体或血清型。假型rAAV的生产公开在例如WO 01/83692中。也涵盖其他类型的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年)。各种AAV血清型的基因组的核苷酸序列在本领域是已知的。

[0264] 在一些情况下,rAAV包含自身互补的基因组。如本文所定义,包含“自身互补”或“双链”基因组的rAAV是指其已被工程化、从而rAAV的编码区被设置为形成分子内双链DNA模板的rAAV,如McCarty等人所述。自身互补的重组腺相关病毒(scAAV)载体促进高效的转导,不依赖于DNA合成。Gene Therapy,8(16):1248-54(2001年)。本公开在一些情况下考虑使用包含自身互补的基因组的rAAV,因为在感染(例如转导)后,不需要等待细胞介导的rAAV载体基因组的第二链的合成,scAAV的两个互补的一半将会结合形成一个双链DNA(dsDNA)单元,其可以直接进行立即复制和转录。应该理解的是,与在rAAV中发现的完整编码容量(4.7-6kb)相比,包含自身互补基因组的rAAV只能容纳该量的大约一半(≈2.4kb)。

[0265] 在其他情况下,rAAV载体基因组是单链基因组。如本文所定义,“单链”基因组是指不是自身互补的基因组。在大多数情况下,非重组AAV具有单链DNA基因组。有一些迹象表明,为了实现对细胞的高效转导,rAAV应该是scAAV。然而,本公开考虑的是,rAAV载体基因组可能有单链基因组,而不是自互补基因组,理解到rAAV载体基因组的其他遗传修饰可能有助于在目标细胞中获得最佳的基因转录。在一些情况下,本公开涉及能够实现对小鼠眼部前段的高效基因转移的单链rAAV载体基因组。参见Wang等人,Single stranded adeno-associated virus achieves efficient gene transfer to anterior segment in the mouse eye.PLoS ONE 12(8):e0182473(2017年)。

[0266] 在优选的实施方案中,AAV是对内皮细胞具有高度嗜性的AAV变体,如AAV2变体BR1。假型rAAV的生产被公开在例如WO 01/83692中。也考虑了其他类型的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年)。在一些实施方案中,所述rAAV载体基因组是AAV-BR1血清型,并且包含单链基因组。在一些实施方案中,rAAV载体基因组包含AAV2的反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方案中,rAAV载体基因组包含AAV2基因组。

[0267] AAV基因组可能包含野生型AAV序列,或者它们可能包含对野生型AAV序列的一个或多个修饰。在特定实施方案中,AAV基因组包含衣壳蛋白(例如VP1、VP2和/或VP3)中的一

个或多个氨基酸修饰,例如取代、缺失或插入。在特别的实施方案中,当AAV基因组被提供给受试者时,修饰提供了降低的免疫原性。

[0268] rAAV的衣壳蛋白可以是经修饰的,以便将rAAV靶向到特定的感兴趣的目标组织,如内皮细胞和/或内皮顶端细胞。在一些实施方案中,rAAV被直接注射到脑室内空间、静脉内注射或通过脑室内和静脉内联合递送到受试者。

[0269] 在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒是AAV2 rAAV病毒颗粒的变体。衣壳可能是AAV2衣壳或其功能变体。AAV2 VP1的多肽序列如SEQ ID NO:76所示。在一些实施方案中,AAV2衣壳与例如下述参考AAV2衣壳具有至少95%的序列同一性:MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKP GPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERL KEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADS VPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYK QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANN LTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVS KTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIR TTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPP PQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVY SEPRPIGTRYLTRNL

[0270] (SEQ ID NO:76)。

[0271] 在一些实施方案中,衣壳蛋白由在质粒上反式提供给转移质粒的多核苷酸编码。在一些实施方案中,AAV-BR1 cap的多核苷酸序列与SEQ ID NO:103共享至少98%、至少99%或100%的序列同一性:ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAG GAATAAGACAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGG GGTCTTGTGCTTCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGA CGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACC ACGCCGACGCGGAGTTTCAGGAGCGCCTTAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAG GCGAAAAAGAGGGTTCTTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCCGGGAAAAAAGAGGCCGGT AGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGA ATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCCCCAGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGT CTGGGAACTAATACGATGGCTACAGGCAGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAA TTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCC TGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAACAAATTTCCAGCCAATCAGGAGCCTCGAACGACAATCACTACTTTGGC TACAGCACCCCTTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAAAGACTCAT CAACAACAACTGGGGATTCCGACCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTTAACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGCAGA ATGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCG TACGTCCTCGGCTCGGCGCATCAAGGATGCCTCCCGCCGTTCCCAGCAGACGTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATA CCTCACCCTGAACAACGGGAGTCAGGCAGTAGGACGCTCTTCATTTTACTGCCTGGAGTACTTTCCTTCTCAGATGC TGCGTACCGGAAACAACTTTACCTTCAGCTACACTTTTGAGGACGTTCCTTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAG AGTCTGGACCGTCTCATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAAACACTCCAAGTGGAAC

CACCACGCAGTCAAGGCTTCAGTTTTCTCAGGCCGGAGCGAGTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAACTGGCTTCCTG
GACCCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCT
ACCAAGTACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGA
AAAGTTTTTTCCTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGG
TCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAAC
CTCCAGAGAGGCCAGAGAGGCAATCGGGGGACTGAGTGGGATGCCCAGGCGGCCACCGCAGATGTCAACACACAAGG
CGTTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGG
ACGGACATTTTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTCGGACTTAAACACCCTCCTCCACAGATTCTCATCAAGAAC
ACCCCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGCGGCAAAGTTTGCTTCCTTCATCACACAGTACTCCACGGG
ACAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAATTCAGTACACTT
CCAACTACAACAAGTCTGTTAATGTGGACTTTACTGTGGACACTAATGGCGTGTATTCAGAGCCTCGCCCCATTGGC
ACCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAA

[0272] (SEQ ID NO:103)。

[0273] 在一些实施方案中,本公开进一步提供了AAV-BR1 VP1及其功能变体的蛋白序列。AAV-BR1 VP1多肽的序列如SEQ ID NO:104所示。在一些实施方案中,AAV VP1的序列与SEQ ID NO:104共享至少98％、至少99％或100％的序列同一性:MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLK
PGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQER
LKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDAD
SVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLY
KQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIAN
NLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTF
SYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRV
SKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEI
RTTNPVATEQYGSVSTNLQRGQRGNRGTEWDAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPL
MGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNV
DFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0274] (SEQ ID NO:104)。

[0275] 在一些实施方案中,本公开进一步提供了AAV-BR1 VP2及其功能变体的蛋白序列。AAV-BR1 VP1多肽的序列如SEQ ID NO:105所示。在一些实施方案中,AAV VP2的序列与SEQ ID NO:105共享至少98％、至少99％或100％序列同一性:

[0276] MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDAD

[0277] SVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN

[0278] SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGA

[0279] SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK

[0280] RLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYV

[0281] LGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLE

[0282] YFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ

[0283] YLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYR

[0284] QQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASH

[0285] KDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPV

[0286] ATEQYGSVSTNLQRGQRGNRGTEWDAQAATADVNTQGVLPGM

[0287] VWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIL

[0288] IKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSK

[0289] RWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0290] (SEQ ID NO:105)。

[0291] 在一些实施方案中,本公开进一步提供了AAV-BR1 VP3及其功能变体的蛋白序列。AAV-BR1 VP1多肽的序列如SEQ ID NO:106所示。在一些实施方案中,AAV VP3的序列与SEQ ID NO:106共享至少98%、至少99%或100%序列同一性:

[0292] MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTST

[0293] RTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRF

[0294] HCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTT

[0295] TIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQ

[0296] YGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDV

[0297] PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFS

[0298] QAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGAT

[0299] KYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEK

[0300] TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGQRGNRGT

[0301] EWDAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTD

[0302] GHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFI

[0303] TQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFT

[0304] VDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0305] (SEQ ID NO:106)。

[0306] 在一些实施方案中,衣壳包含位于如SEQ ID NO 76所示的AAV2VP1参考序列内GH环中大约第588和589位氨基酸残基之间的插入。在一些实施方案中,插入序列与SEQ ID NO:107共享至少98%、至少99%或100%序列同一性:

[0307] XDGXXWX,其中每个X是任何氨基酸。

[0308] (SEQ ID NO:107)。

[0309] 在一些实施方案中,相比于SEQ ID NO 76所述的VP1参考序列,所述衣壳包含位于GH环中第588和589位氨基酸残基之间的插入。在一些实施方案中,所述插入序列与SEQ ID NO:108共享至少98%、至少99%或100%序列同一性:

[0310] ADGVQWT

[0311] (SEQ ID NO:108)。

[0312] 在一些实施方案中,相比于SEQ ID NO 76所述的VP1参考序列,所述衣壳包含位于GH环中第588和589位氨基酸残基之间的插入。在一些实施方案中,所述插入序列与SEQ ID NO:109共享至少98%、至少99%或100%序列同一性:

[0313] DDGVSWK

[0314] (SEQ ID NO:109)。

[0315] 在一些实施方案中,相比于SEQ ID NO 76所述的VP1参考序列,所述衣壳包含位于

GH环中第588和589位氨基酸残基之间的插入。在一些实施方案中,所述插入序列与SEQ ID NO:110共享至少98%、至少99%或100%序列同一性:

[0316] SDGLTWS

[0317] (SEQ ID NO:110)。

[0318] 在一些实施方案中,相比于SEQ ID NO 76所述的VP1参考序列,所述衣壳包含位于GH环中第588和589位氨基酸残基之间的插入。在一些实施方案中,所述插入序列与SEQ ID NO:111共享至少98%、至少99%或100%序列同一性:

[0319] SDGLAWV

[0320] (SEQ ID NO:111)。

[0321] 在一些实施方案中,相比于SEQ ID NO 76所述的VP1参考序列,所述衣壳包含位于GH环中第588和589位氨基酸残基之间的插入。在一些实施方案中,所述插入序列与SEQ ID NO:112共享至少98%、至少99%或100%序列同一性:

[0322] NRGTEWD

[0323] (SEQ ID NO:112)。

[0324] 本公开的rAAV病毒颗粒中使用的其他AAV衣壳包括在专利公开号WO 2009/012176 A2和WO 2015/168666 A2中公开的那些。

[0325] 使用AAV-BR1可能导致Glut1转基因在内皮细胞特异性表达,从而提高转基因的功效。

[0326] 在一些实施方案中,rAAV载体基因组不是AAV2基因组。在不受理论约束的情况下,使用AAV2基因组会导致除了内皮细胞外还有神经元细胞的转导,或者替代内皮细胞,发生神经元细胞的转导。在不受理论约束的情况下,AAV2基因组在CNS及其相关脑血管系统内的传播受到其与硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)受体相互作用的限制。

[0327] 药物组合物及试剂盒

[0328] 在一个方面,本公开提供了包含本公开所述的rAAV病毒颗粒以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0329] 为了施用的目的,例如通过注射,可以使用各种溶液,如无菌水溶液。如果需要,这些水溶液可以是缓冲型的,并且首先用盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。游离酸(DNA含有酸性磷酸基团)或药理学上可接受的盐形式的rAAV溶液可以在与表面活性剂(如泊洛沙姆188,例如至少0.001%或0.01%)适当混合的水中制备。也可以在甘油、液体聚乙二醇和它们的混合物以及油中制备rAAV的分散体。在普通的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。在这方面,所采用的无菌水介质都能够通过本领域技术人员熟知的标准技术容易地获得。

[0330] 适用于注射使用的药物形式包括但不限于无菌水溶液或分散体,以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,药物形式是无菌的,并且必须足够流动以便于注射。它必须在制造和储存条件下稳定,并且必须防腐以避免细菌和真菌等微生物的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其中包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等)、它们的适当混合物,以及植物油。适当的流动性可以通过例如,使用如卵磷脂这样的涂层、在分散体的情况下保持所需的颗粒大小,以及使用表面活性剂来维持。通过各种抗菌和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞

等),可以防止微生物的作用。在许多情况下,优选地包括等张剂,例如糖或氯化钠。通过使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶),可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0331] 无菌注射溶液可以通过下述方法制备:将在适当溶剂中的所需量的rAAV与所需的上文列举的各种其他成分一起混合,然后进行过滤灭菌。通常,分散体通过下述方法制备:将灭菌后的活性成分加入无菌载体中,该载体含有基本的分散介质和上文列举的其他所需成分。对于用于制备无菌注射溶液的无菌粉末,制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这些技术可以从之前无菌过滤的溶液产生活性成分以及任何额外所需的成分的粉末。

[0332] 在另一方面,本公开包括包含本公开所述的rAAV病毒颗粒和使用说明的试剂盒。

[0333] 使用方法

[0334] 在一个方面,本公开提供了一种增加细胞中GLUT1活性的方法,包括将所述细胞与本公开的rAAV接触。在另一个方面,本公开提供了一种增加受试者中GLUT1活性的方法,包括给受试者施用本公开的rAAV。在一些实施方案中,细胞和/或受试者缺乏SLC2A1信使RNA或GLUT1蛋白表达水平和/或活性和/或包含SLC2A1的功能丧失突变。该细胞可能是内皮细胞,例如内皮顶端细胞或脑血管内皮细胞。

[0335] 在一些实施方案中,该方法恢复了内皮顶端细胞的正常功能。在一些实施方案中,该方法恢复了细胞培养和/或体内的GLUT1转运蛋白表达水平。在一些实施方案中,该方法恢复了细胞培养和/或体内的正常葡萄糖转运和代谢(例如糖酵解、乳酸产生)。在一些实施方案中,该方法恢复了中枢神经系统(CNS)中微血管系统的正常血管发生和/或发育。

[0336] 在一些实施方案中,该方法恢复脑血管内皮细胞的正常功能。在一些实施方案中,该方法恢复细胞培养和/或体内的GLUT1转运蛋白表达水平。在一些实施方案中,该方法恢复细胞培养和/或体内的正常葡萄糖转运和代谢(例如糖酵解、乳酸产生)。在一些实施方案中,该方法恢复中枢神经系统(CNS)中微血管系统的正常血管发生和/或发育。

[0337] 治疗方法

[0338] 在另一方面,本公开提供了一种治疗需要治疗的受试者的疾病或失调的方法,包括向受试者施用本公开的rAAV病毒颗粒的有效量。在一些实施方案中,该疾病或失调是神经系统疾病或失调。在一些实施方案中,所述受试者患有SLC2A1表达或功能的遗传破坏。在一些实施方案中,该疾病或失调是GLUT1缺乏综合征(GLUT1 DS)。

[0339] AAV介导的GLUT1蛋白递送到中枢神经系统的血管系统可能增加寿命,预防、减少、缓解或减轻神经元变性、早期发作的癫痫、发育迟缓、获得性小头畸形(头部生长减速)、复杂运动障碍(痉挛、共济失调、肌张力障碍)、阵发性眼头运动,以及/或者脑脊液中乳酸和/或葡萄糖浓度较低(脑脊液糖分过少)。在一些实施方案中,该方法在疾病早期提供治疗,例如在新生儿、婴儿或青少年中。

[0340] 在一些实施方案中,本公开所述的方法导致受试者中野生型GLUT1蛋白表达的增加(例如,增加约5%至约10%,约10%至约20%,约20%至约30%,约30%至约40%,约40%至约50%,约50%至约70%,或约70%至约100%)。在特定实施方案中,本公开所述的方法导致受试者中野生型与突变型GLUT1蛋白比率的增加(例如,增加约5%至约25%,约25%至约50%,约50%至约100%,或约100%至约200%)。

[0341] 在一些实施方案中,本公开的方法导致内皮细胞中野生型GLUT1蛋白表达的增加(例如,增加约5%至约10%,约10%至约20%,约20%至约30%,约30%至约40%,约40%至

约50％,约50％至约70％,或约70％至约100％)。在特定实施方案中,本公开的方法导致内皮细胞中野生型与突变型GLUT1蛋白比率的增加(例如,增加约5％至约25％,约25％至约50％,约50％至约100％,或约100％至约200％)。

[0342] 本文公开的方法可能在脑和/或中枢神经系统的血管系统中提供高效的生物分布。它们可能导致所有或大部分内皮细胞(例如,内皮顶端细胞)中的持续表达。值得注意的是,本文公开的方法可能在施用rAAV病毒颗粒后,在受试者发育和衰老过程中提供GLUT1蛋白的持久表达。

[0343] 本发明也考虑了联合疗法。特别地考虑将本发明所述的方法与标准医疗治疗(例如,糖皮质激素或局部减压药物)相结合,以及与新型疗法相结合。在一些情况下,受试者可能接受类固醇和/或免疫抑制剂组合治疗,从而预防或减少对本文所述的rAAV施用的免疫反应。

[0344] rAAV载体基因组的治疗有效量,例如用于脑室内(ICV)、枕大池内(intra-cisterna magna,ICM)注射或静脉内(IV)注射,是如下rAAV的剂量:从大约$1\times10^{12}$vg/kg到大约$5\times10^{12}$vg/kg,或大约$1\times10^{13}$vg/kg到大约$5\times10^{13}$vg/kg,或大约$1\times10^{14}$vg/kg到大约$5\times10^{14}$vg/kg,或大约$1\times10^{15}$vg/kg到大约$5\times10^{15}$vg/kg,按脑重计算。本发明还包括包含这些范围的rAAV载体基因组的组合物。

[0345] 例如,在特别的实施方案中,rAAV载体基因组的治疗有效量是大约$1\times10^{10}$vg、大约$2\times10^{10}$vg、大约$3\times10^{10}$vg、大约$4\times10^{10}$vg、大约$5\times10^{10}$vg、大约$6\times10^{10}$vg、大约$7\times10^{10}$vg、大约$8\times10^{10}$vg、大约$9\times10^{10}$vg、大约$1\times10^{12}$vg、大约$2\times10^{12}$vg、大约$3\times10^{12}$vg、大约$4\times10^{12}$vg、大约$4\times10^{13}$vg和大约$4\times10^{14}$vg的剂量。本发明还包括包含这些剂量的rAAV载体基因组的组合物。

[0346] 在一些实施方案中,例如进行ICV注射时,rAAV载体基因组的治疗有效量的范围是$1\times10^{10}$vg/半球到$2\times10^{14}$vg/半球,或大约$1\times10^{10}$vg/半球、大约$1\times10^{11}$vg/半球、大约$1\times10^{12}$vg/半球、$1\times10^{13}$vg/半球或大约$1\times10^{14}$vg/半球。在一些实施方案中,例如进行ICM注射时,rAAV载体基因组的治疗有效量是总剂量$2\times10^{10}$vg到$2\times10^{14}$vg的范围,或大约$2\times10^{10}$vg总剂量、约$2\times10^{11}$vg总剂量、约$2\times10^{12}$vg总剂量、约$2\times10^{13}$vg总剂量或约$2\times10^{14}$vg总剂量。

[0347] 在一些实施方案中,所述治疗组合物每注射体积包含超过约$1\times10^{9}$、$1\times10^{10}$或$1\times10^{11}$个rAAV载体基因组。在一些实施方案中,所述治疗组合物每mL包含超过约$1\times10^{11}$、$1\times10^{12}$、$1\times10^{13}$或$1\times10^{14}$个rAAV基因组。在一些实施方案中,所述治疗组合物每mL包含少于约$1\times10^{14}$、$1\times10^{13}$或$1\times10^{12}$个rAAV基因组。

[0348] 可以通过分析阵发性眼头运动、减少癫痫频率的替代标志物(全面强直阵挛和肌阵挛发作)、脑脊液(CSF)中的乳酸和/或葡萄糖浓度、发育迟缓、舞蹈症、肌张力障碍和小头畸形的评估来评估患者的功能改善、临床效益或疗效。对认知、运动、言语功能的计量使用标准疾病评分量表,如哥伦比亚神经学评分、综合智力评估、适应行为综合、言语和非言语认知技能和视觉运动整合,以及六分钟步行测试。适合应用于儿童残疾的认知和发育评估,包括皮巴迪动作发展量表第二版(PDMS-2)和贝利婴幼儿发育量表第三版。粗大运动功能评定量表(GFMF-88)、儿科残疾评估量表(PEDI)。这些或类似的量表,以及患者报告的生活质量结果,如采用3点量表(平均持续时间减少、无变化或增加)的护理人员对癫痫发作持续时间变化的总体印象(CGICSD)、儿童生活质量量表(PedsQL™)和文兰适应行为量表-第二版,

可能表明疾病组分的改善。基线和治疗后的脑磁共振成像可能显示与年龄匹配的患者的对照数据和GLUT1缺乏症患者的历史数据相比,患者年龄的脑容量改善或正常化。

[0349] 临床效益可以通过寿命延长、达到正常的神经发育里程碑、脑脊液中葡萄糖浓度正常化、阵发性眼头运动频率或幅度减少、癫痫发作活动(包括肌阵挛、阵挛、全面强直阵挛和/或癫痫性痉挛)的减少或缺乏、复杂运动障碍如痉挛、肌张力障碍和/或共济失调的改善或无发展,以及哥伦比亚神经评分和/或六分钟步行测试中的表现改善或正常来观察。神经保护和/或神经修复效应的证据可能在所有前述指标和/或在磁共振成像(MRI)上通过确定脑整体大小、缺乏小头畸形和/或皮层和/或小脑萎缩来表现。

[0350] 在一些实施方案中,相比于与含有内源Glut1启动子或遍在启动子的载体接触的细胞,或者相比于施用了该载体的受试者的细胞,所述方法导致细胞的葡萄糖摄取增加。在一些情况下,所述增加为至少为5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%或至少50%。在一些情况下,所述增加为至少1.1倍、至少1.2倍、至少1.3倍、至少1.4倍、至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍或至少1.8倍。该载体可以是本文公开的任何载体。该细胞可以是内皮细胞或神经元细胞。例如,该方法可以增加人脑微血管系统内皮细胞的葡萄糖摄取,可以是体外或体内。

[0351] 组合物施用

[0352] 组合物的有效剂量可以通过本领域的标准途径施用,包括但不限于静脉内、脑内、鞘内、脑池内或脑室内施用。在一些情况下,施用包括静脉内、脑内、鞘内、脑池内或脑室内注射。施用可以通过有或没有Trendelenburg倾斜的鞘内注射进行。枕大池内(ICM)递送可以通过在鞘内(IT)空间的导管进入来实现。脑室内注射可以通过磁共振成像(MRI)引导的神经外科靶向来实现。

[0353] 在一些实施方案中,本公开提供了全身施用有效剂量的本发明所述的rAAV和组合物。例如,全身性施用可能是向循环系统施用,从而影响整个身体。全身性施用包括通过注射或输注进行的静脉内施用。

[0354] 在一些实施方案中,本发明的rAAV施用可以通过使用任何将rAAV重组载体递送到动物目标组织中的物理方法来实现。施用包括但不限于向中枢神经系统(CNS)或脑脊液(CSF)注射和/或静脉内注射。

[0355] 在一些实施方案中,本公开的方法包括脑室内、枕大池内、鞘内或脑实质内施用。输注可以使用专门的插管、导管、注射器/针头以及输注泵进行。任选地,注射部位的靶向可以通过MRI引导的成像来完成。施用可能包括将有效量的rAAV病毒颗粒或包含rAAV病毒颗粒的药物组合物递送到中枢神经系统(CNS)。这些可以通过例如单侧脑室内注射、双侧脑室内注射、带有Trendelenburg倾斜程序的枕大池内输注或不带Trendelenburg倾斜程序的枕大池内输注、带有Trendelenburg倾斜程序的鞘内输注或不带Trendelenburg倾斜程序的鞘内输注来实现。本公开的组合物还可以通过静脉内施用。

[0356] 在一些实施方案中,本公开的方法包括通过静脉内(IV)注射进行rAAV施用。在一些实施方案中,本公开的方法包括通过脑室内(ICV)注射进行rAAV施用。在一些实施方案中,本公开的方法包括通过结合IV注射与ICV注射进行rAAV施用。

[0357] 直接向中枢神经系统(CNS)递送可能涉及靶向脑室内空间(可以是单侧或双侧)、特定的神经元区域或含有神经元靶点的更广泛的脑区。可以利用多种成像技术(MRI、CT、CT

结合MRI融合)、使用任意数量的软件规划程序(例如,Stealth系统、Clearpoint神经导航系统、Brainlab、Neuroinspire等)来完成个体患者的脑室内空间、脑区和/或神经元靶点的选择以及随后在术中递送AAV。脑室内空间或脑区靶向和递送可能涉及使用标准立体定位架(Leksell、CRW)或使用有或没有手术中MRI的无框架方法。AAV的实际递送可以使用带有或不带内腔的材料的针头或插管进行注射(例如Smartflow插管、MRI干预插管),所述内腔衬有防止rAAV吸附的材料。递送设备由注射器和具有预编程的输注速率和体积的自动输注或微输注泵组成。注射器/针头组合或对于针头而言仅引导插管可以直接与立体定位框接口。输注可能包括恒定流速或随着递送运流而增强的变化流速。

[0358] 实施例实施例1:临床前生物活性和效力

[0359] 使用图2-8中公开的载体基因组生产具有AAV-BR1衣壳的重组AAV病毒颗粒。将它们在GLUT1缺乏症疾病小鼠模型中进行评估。一个模型是使用带flox的GLUT1基因的转基因动物与在组成型启动子或内皮细胞特异性启动子(例如Tie-2)控制下表达Cre/lox的转基因动物杂交。产生的小鼠在GLUT1位点是杂合缺失的,表现出模拟人类疾病的发育表型。第二个GLUT1 DS小鼠模型是通过靶向破坏小鼠GLUT-1基因的启动子和外显子1区域产生的杂合单倍性不足小鼠(GLUT-$1^{+/-}$小鼠)。其他动物模型可能包括其中GLUT1基因具有S324P点突变的GLUT1 DS模型。

[0360] 在体外(使用内皮细胞和神经元细胞系)和体内(使用野生型和GLUT1 DS模型小鼠)评估基因表达和剂量反应。转染了SLC2A1表达载体的培养细胞(人胚肾细胞293,HEK293;人脐静脉内皮细胞,HUVEC;人脑源性内皮细胞,bEND3;人脑微血管系统内皮细胞,HBEC-5i;人脑微血管内皮细胞系,hCMEC/D3(血脑屏障模型);人胶质少突胶质细胞杂合细胞,MO3.13;人神经母细胞瘤,SH-SY5Y)将通过定量实时PCR分析揭示转导效率,通过ELISA和/或蛋白印迹法测定GLUT1水平。在GLUT1 DS小鼠中体内揭示AAV载体构建体的概念验证和效力,其中相比于GLUT1 DS突变小鼠对照,通过免疫标记法确定转基因(GLUT1蛋白)在CNS和CNS血管系统中的表达,使用正电子发射断层扫描(PET)检测增强的脑毛细血管密度和/或CNS中血管大小的增加,脑葡萄糖摄取的增加,使用标准检测方法如旋转棒和/或垂直杆检测法测定脑脊液葡萄糖水平或乳酸水平和/或脑脊液/血液的葡萄糖比例的增加,脑脊液乳酸水平的增加,以及运动性能的改善。通过静脉内注射或直接注射到脑室内递送AAV载体构建体(单独和/或联合使用这些施用途径)后,GLUT1 DS小鼠模型的体内基因表达和疗效非常明显。

[0361] 实施例2:使用内皮细胞启动子对GLUT1表达进行体外评估

[0362] 使用人脑微血管系统内皮细胞(hCMEC/D3)在体外评估基因表达。评估转染了在hFLT1、mTIE1、hGlut1或CMV启动子(示意图见图10C)控制下编码SLC2A1的AAV9载体的hCMEC/D3细胞的Glut1表达(图9)。从内皮细胞启动子(hFLT1和mTIE1)的表达与从Glut1启动子的表达相当,并且远低于从CMV启动子的表达。通过免疫荧光显微镜观察到这些构建体之间表达水平的相似模式(图10A和图10B)。

[0363] 令人惊讶的是,转染或转导在内皮细胞启动子控制下的该基因的人脑微血管系统内皮细胞对2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG)的摄取量大于对照Glut1启动子,其中hFLT-1启动子显示出最高的2-DG(葡萄糖)摄取水平(图11A-11C、图12和图13)。在一系列2-DG浓度(图12A;0、0.1、0.5和1mM)和转染后的不同时间点(图12B)也观察到使用hFLT-1启动子构建体有更

多的2-DG(葡萄糖)摄取量,并且在一些情形下,与使用CMV启动子观察到的水平相当,或者略高于使用CMV启动子(图11A-11C;图12A、12B;图13)。

[0364] 图9.转染人类脑微血管系统内皮细胞(hCMEC/d3s)后转基因蛋白(Glut1-GFP)的表达。

[0365] 图10A.转染含有几种内皮细胞启动子之一驱动Glut1-GFP转基因表达的构建体72小时后的GFP荧光。

[0366] 图10B.转染含有两种遍在启动子(CMV或CAG)之一的构建体、不含Glut1的对照载体(CMV-GFP)或未转染(No NFX)72小时后的GFP荧光。图像使用Operetta CLS™(PerkinElmer®)获得。

[0367] 图10C.含有感兴趣的启动子(hFLT1、mTie、hTie或hGlut1)和GLUT1(SLC2A1)基因(T2A连接的GFP)以及调控元件、侧翼有AAV2反向末端重复序列(ITR)的表达盒的示意图。

[0368] 图11A-11C.在表达人类GLUT1(SLC2A1)后,hCMEC/d3细胞中的2-脱氧-D-葡萄糖(葡萄糖)的摄取。向人类脑微血管系统内皮细胞(hCMEC/d3s)转染表达CAG-GFP的质粒(CON;阴性对照)或hGLUT1-t2A-eGFP转基因,所述转基因由几种内皮细胞特异性启动子(即,hFLT1、mTie、hTie或hGlut1)之一或遍在CMV启动子或CAG启动子驱动。采用培养基中0.5mM 2-脱氧葡萄糖(2-DG),使用基于发光的试剂盒(Promega®)测量葡萄糖(2-DG)的摄取。通过相差显微镜成像,针对总细胞数将葡萄糖的摄取标准化[误差棒代表S.E.M;每种条件6个重复]。

[0369] 图11A.在第一次实验中,转染后72小时测量葡萄糖(2-DG)摄取。

[0370] 图11B.在第二次实验中,转染后72小时测量葡萄糖(2-DG)摄取。

[0371] 图11C.转染后96小时测量葡萄糖(2-DG)摄取。

[0372] 图12A.显示了表达人类Glut1(SLC2A1)后,在72小时时间点hCMEC/D3细胞的葡萄糖(2-DG)摄取。

[0373] 图12B.显示了表达人类Glut1(SLC2A1)后,在96小时时间点hCMEC/D3细胞的葡萄糖(2-DG)摄取。

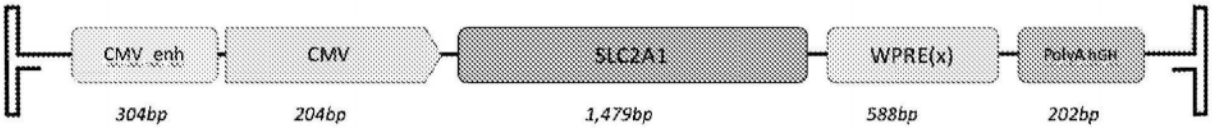
[0374] 图13.在hCMEC/D3细胞中由AAV9介导的hGLUT1表达(SLC2A1)后,2-脱氧-D-葡萄糖(葡萄糖)的摄取。向人类脑微血管系统内皮细胞(hCMEC/d3)转导表达CAG-GFP(阴性对照)或hGLUT1转基因的AAV9载体(3x $10^5$载体基因组/细胞),所述转基因由几种内皮细胞特异性启动子(即,hFLT1、mTie1或hGlut1)之一或遍在CMV启动子驱动。使用基于发光的葡萄糖摄取检测试剂盒(Promega®)在转导后72小时测量葡萄糖(2-DG)摄取,并且使用RealTime-Glo MT细胞活力检测试剂盒(Promega®)按每个细胞标准化[误差棒代表S.E.M;每种条件4个重复]。

[0375] 实施例3:在GLUT1缺乏动物模型中体内评估AAV-BR1衣壳介导的使用内皮细胞启动子的GLUT1表达

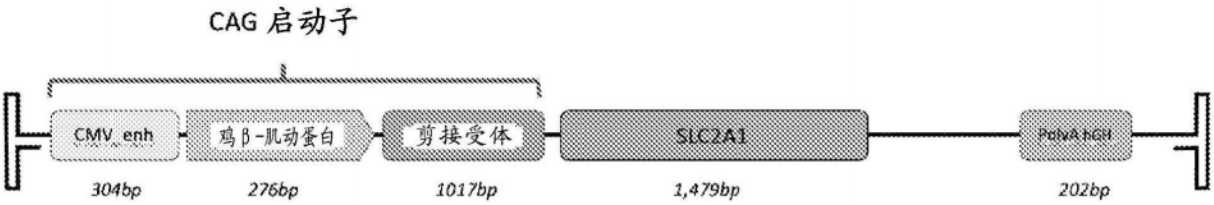
[0376] 将在GLUT1缺乏综合征(DS)的小鼠模型中进行一系列实验,评估AAV-BR1衣壳介导的GLUT1转运蛋白表达的体内效应。该模型采用的小鼠由于小鼠GLUT-1基因的启动子和外显子1区域的靶向性破坏而成为杂合单倍性不足(GLUT-$1^{+/-}$小鼠),表现出人类GLUT DS的特征,如癫痫活动、脑脊液糖分过少、小头畸形和运动功能损害(Wang等人,Hum Mol Gen,

2006;Tang等人,Nat Comm,2016)。在不同剂量和不同施用途径(静脉内或脑室内)下通过由遍在启动子(CMV)或几个内皮细胞启动子(例如,hFLT-1)之一驱动的GLUT1转基因的表达对AAV-BR1病毒颗粒进行评估。将评估使用AAV-BR1病毒颗粒递送后,内皮细胞启动子介导的GLUT1转基因表达能在多大程度上预防或减轻这种小鼠模型的功能和病理缺陷。通过与未处理的GLUT-$1^{+/-}$对照小鼠进行比较,将揭示AAV-BR1介导的Glut1蛋白表达在向杂合单倍性不足小鼠施用时的潜在益处,包括改善的或正常化的体重增长、运动测试(例如旋转棒、垂直杆检测)的行为表现、脑脊液葡萄糖水平、脑重以及脑微血管的完整性和大小(例如脑毛细血管密度、血管大小、血管分支点数量)。

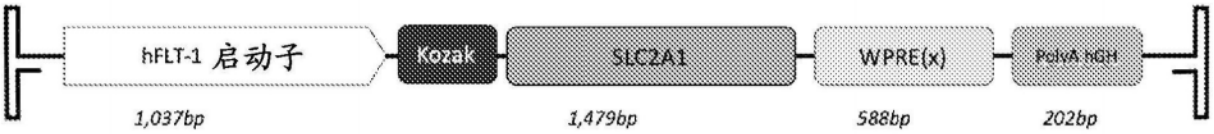
1.CMV-SLC2A1-WPRE – 3,299bp



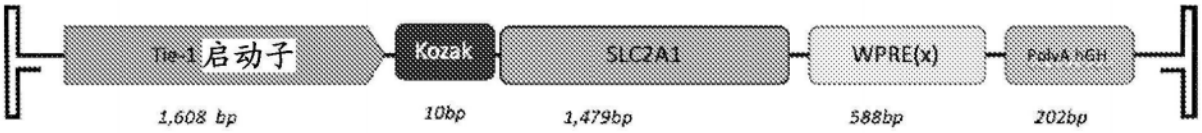

2.CAG-SLC2A1 – 3,750 bp



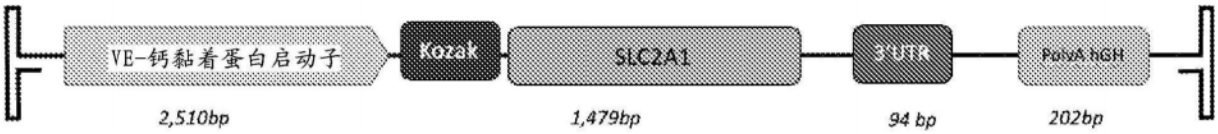

3.hFLT1-SLC2A1 – 3,745 bp




4.Tie1-SLC2A1 – 4,258bp




5.VE-Cadherin-SLC2A1 – 4,716 bp




6.mTie1-SLC2A1 – 3,850bp

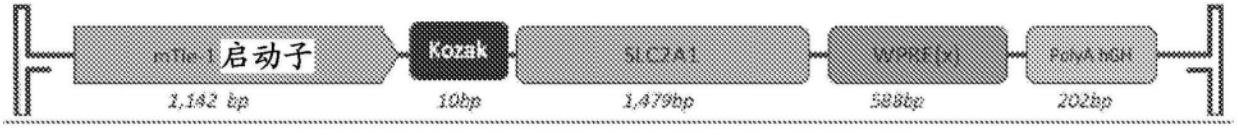



图1

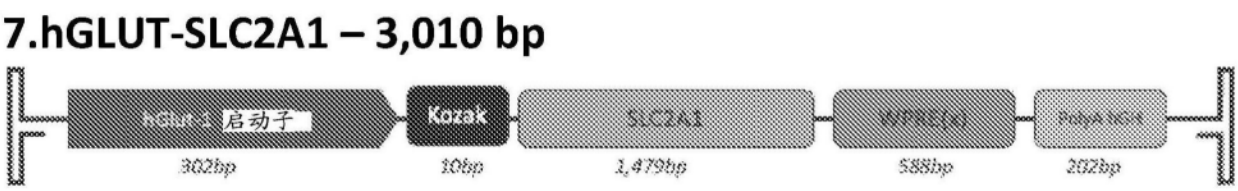
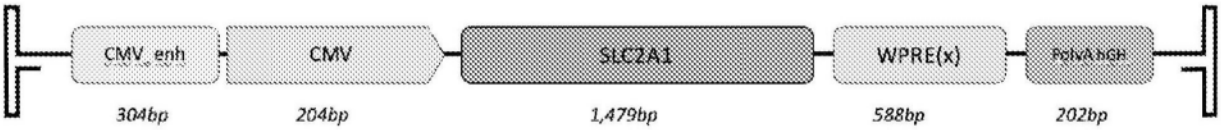

7.hGLUT-SLC2A1 – 3,010 bp
hGlut-1 启动子
Kozak
SLC2A1
302bp
106bp
1,479bp
588bp
202bp

图1续

**CMV-SLC2A1-WPRE – 3,299bp**

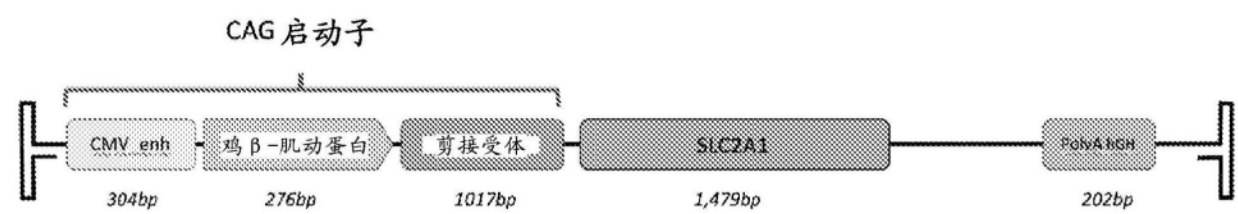



gcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgag
cgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtaCTCTG
GAGACGCGTTACATACGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG
CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAG
TACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCA
ATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT
GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACC
GTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAG
CCTCCGCGGATGGAGCCCAGCAGCAAGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCCGTGGGAGGAGC
AGTGCTTGGCTCCCTGCAGTTTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCCAGAAGGTGATCGAG
GAGTTCTACAACCAGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCCACCACGCTCACCACGC
TCTGGTCCCTCTCAGTGGCCATCTTTTCTGTTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGTGGGCCTTTTCG
TTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTCAATGCTGATGATGAACCTGCTGGCCTTCGTGTCCGCCGTGCT
CATGGGCTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCCGCTTCATCATCGGTGTG
TACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTCACCCACAGCCCTTCGTG
GGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCGTCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTCGGCCT
GGACTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGTGGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGCCCTG
CTGCAGTGCATCGTGCTGCCCTTCTGCCCCGAGAGTCCCCGCTTCCTGCTCATCAACCGCAACGAGG
AGAACCGGGCCAAGAGTGTGCTAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTGACGTGACCCATGACCTGCAG
GAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCAGATGATGCGGGAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCTGTTCCG
CTCCCCCGCCTACCGCCAGCCCATCCTCATCGCTGTGGTGCTGCAGCTGTCCCAGCAGCTGTCTGGCA
TCAACGCTGTCTTCTATTACTCCACGAGCATCTTCGAGAAGGCGGGGGGTGCAGCAGCCTGTGTATGC
CACCATTGGCTCCGGTATCGTCAACACGGCCTTCACTGTCGTGTCGCTGTTTGTGGTGGAGCGAGCA
GGCCGGCGGACCCTGCACCTCATAGGCCTCGCTGGCATGGCGGGTTGTGCCATACTCATGACCATC
GCGCTAGCACTGCTGGAGCAGCTACCCTGGATGTCCTATCTGAGCATCGTGGCCATCTTTGGCTTTG
TGGCCTTCTTTGAAGTGGGTCCTGGCCCCATCCCATGGTTCATCGTGGCTGAACTCTTCAGCCAGGGT
CCACGTCCAGCTGCCATTGCCGTTGCAGGCTTCTCCAACTGGACCTCAAATTTCATTGTGGGCATGTG
CTTCCAGTATGTGGAGCAACTGTGTGGTCCCTACGTCTTCATCATCTTCACTGTGCTCCTGGTTCTGTT
CTTCATCTTCACCTACTTCAAAGTTCCTGAGACTAAAGGCCGGACCTTCGATGAGATCGCTTCCGGCT
TCCGGCAGGGGGGAGCCAGCCAAAGTGACAAGACACCCGAGGAGCTGTTCCATCCCCTGGGGGCT
GATTCCCAAGTGTGATAATGGATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTT
AACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCC
CGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCC
GTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATT

图2

GCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATC
GCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGT
CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTC
CTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGC
GGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCAT
CATTGCCTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCAC
TCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTA
TAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCCCAAGTTGGGAAGAAACCTGTAG
GGCCTGCGTTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACATTTCTGCTCACTGCAACCTCCTCCTCCCTGGG
TTCtacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgct
cgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgc

图2续

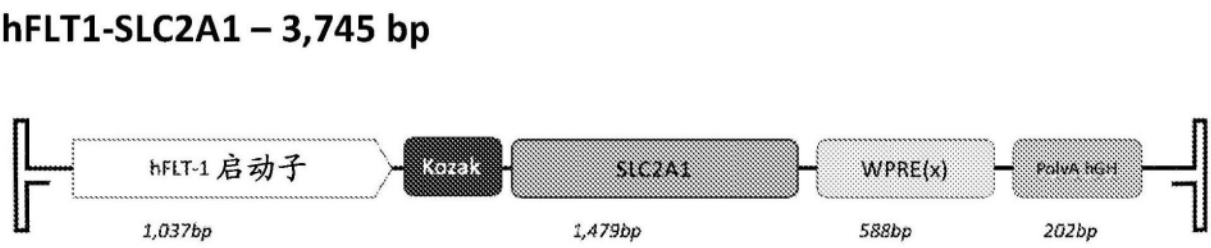



gcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgag
cgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtaCTCTG
GAGACGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG
AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATT
GACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA
CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTC
ACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGC
GATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGG
CGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTA
TGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGC
GCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACC
GCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTT
AATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTG
CGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCC
GCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCG
CGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGG
CTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAA
CCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGG
GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGG
CGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCG
GCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGA
CTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGC
GCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCC
GCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG
GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACC
ATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATT
TTGGCAAAGAATTCATGGAGCCCAGCAGCAAGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCCGTGGGA
GGAGCAGTGCTTGGCTCCCTGCAGTTTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCCAGAAGGTG
ATCGAGGAGTTCTACAACCAGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCCACCACGCTC
ACCACGCTCTGGTCCCTCTCAGTGGCCATCTTTTCTGTTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGTGGG
CCTTTTCGTTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTCAATGCTGATGATGAACCTGCTGGCCTTCGTGTCCG
CCGTGCTCATGGGCTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCCGCTTCATCAT
CGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTCACCCACAGCC
CTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCGTCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGT

图3

TCGGCCTGGACTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGTGGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCC
GGCCCTGCTGCAGTGCATCGTGCTGCCCTTCTGCCCCGAGAGTCCCCGCTTCCTGCTCATCAACCGCA
ACGAGGAGAACCGGGCCAAGAGTGTGCTAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTGACGTGACCCATGAC
CTGCAGGAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCAGATGATGCGGGAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCT
GTTCCGCTCCCCCGCCTACCGCCAGCCCATCCTCATCGCTGTGGTGCTGCAGCTGTCCCAGCAGCTGT
CTGGCATCAACGCTGTCTTCTATTACTCCACGAGCATCTTCGAGAAGGCGGGGGTGCAGCAGCCTGT
GTATGCCACCATTGGCTCCGGTATCGTCAACACGGCCTTCACTGTCGTGTCGCTGTTTGTGGTGGAG
CGAGCAGGCCGGCGGACCCTGCACCTCATAGGCCTCGCTGGCATGGCGGGTTGTGCCATACTCATG
ACCATCGCGCTAGCACTGCTGGAGCAGCTACCCTGGATGTCCTATCTGAGCATCGTGGCCATCTTTG
GCTTTGTGGCCTTCTTTGAAGTGGGTCCTGGCCCCATCCCATGGTTCATCGTGGCTGAACTCTTCAGC
CAGGGTCCACGTCCAGCTGCCATTGCCGTTGCAGGCTTCTCCAACTGGACCTCAAATTTCATTGTGG
GCATGTGCTTCCAGTATGTGGAGCAACTGTGTGGTCCCTACGTCTTCATCATCTTCACTGTGCTCCTG
GTTCTGTTCTTCATCTTCACCTACTTCAAAGTTCCTGAGACTAAAGGCCGGACCTTCGATGAGATCGC
TTCCGGCTTCCGGCAGGGGGGAGCCAGCCAAAGTGACAAGACACCCGAGGAGCTGTTCCATCCCCT
GGGGGCTGATTCCCAAGTGTGATCATTGCCTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCC
TCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCA
TTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGC
CCAAGTTGGGAAGAAACCTGTAGGGCCTGCGTTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACATTTCTGCT
CACTGCAACCTCCTCCTCCCTGGGTTCtacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccctagt
gatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccg
ggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgc

图3续



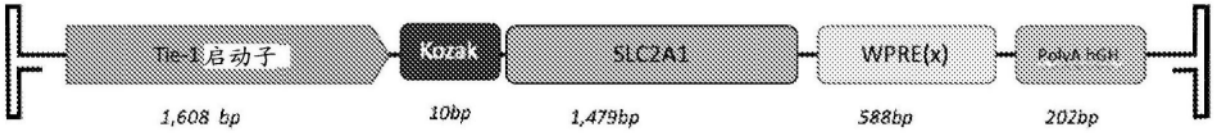

gcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgag
cgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtaCTCTG
GAGACGCGTTACATATTTGCTTCTAGGAAGCAGAAGACTGAGGAAATGACTTGGGCGGGTGCATCA
ATGCGGCCAAAAAAGACACGGACACGCTCCCCTGGGACCTGAGCTGGTTCGCAGTCTTCCCAAAGG
TGCCAAGCAAGCGTCAGTTCCCCTCAGGCGCTCCAGGTTCAGTGCCTTGTGCCGAGGGTCTCCGGTG
CCTTCCTAGACTTCTCGGGACAGTCTGAAGGGGTCAGGAGCGGCGGGACAGCGCGGGAAGAGCAG
GCAAGGGGAGACAGCCGGACTGCGCCTCAGTCCTCCGTGCCAAGAACACCGTCGCGGAGGCGCGG
CCAGCTTCCCTTGGATCGGACTTTCCGCCCCTAGGGCCAGGCGGCGGAGCTTCAGCCTTGTCCCTTCC
CCAGTTTCGGGCGGCCCCCAGAGCTGAGTAAGCCGGGTGGAGGGAGTCTGCAAGGATTTCCTGAG
CGCGATGGGCAGGAGGAGGGGCAAGGGCAAGAGGGCGCGGAGCAAAGACCCTGAACCTGCCGG
GGCCGCGCTCCCGGGCCCGCGTCGCCAGCACCTCCCCACGCGCGCTCGGCCCCGGGCCACCCGCCC
TCGTCGGCCCCCGCCCCTCTCCGTAGCCGCAGGGAAGCGAGCCTGGGAGGAAGAAGAGGGTAGGT
GGGGAGGCGGATGAGGGGTGGGGGACCCCTTGACGTCACCAGAAGGAGGTGCCGGGGTAGGAA
GTGGGCTGGGGAAAGGTTATAAATCGCCCCCGCCCTCGGCTGCTCTTCATCGAGGTCCGCGGGAGG
CTCGGAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTCCCCGGCAGCGGCGGCGGCTCGGAGCGG
GCTCCGGGGCTCGGGTGCAGCGGCCAGCGGGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGGTT
GTCTCCTGGCTGGAGCCGCGAGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGCGGCGAACAAGAGG
ACGGACTCTGGCGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGGAGCGCGGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTC
GCGCTCACCGCCACCATGGAGCCCAGCAGCAAGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCCGTGGGA
GGAGCAGTGCTTGGCTCCCTGCAGTTTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCCAGAAGGTG
ATCGAGGAGTTCTACAACCAGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCCACCACGCTC
ACCACGCTCTGGTCCCTCTCAGTGGCCATCTTTTCTGTTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGTGGG
CCTTTTCGTTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTCAATGCTGATGATGAACCTGCTGGCCTTCGTGTCCG
CCGTGCTCATGGGCTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCCGCTTCATCAT
CGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTCACCCACAGCC
CTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCGTCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGT
TCGGCCTGGACTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGTGGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCC
GGCCCTGCTGCAGTGCATCGTGCTGCCCTTCTGCCCCGAGAGTCCCCGCTTCCTGCTCATCAACCGCA
ACGAGGAGAACCGGGCCAAGAGTGTGCTAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTGACGTGACCCATGAC
CTGCAGGAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCAGATGATGCGGGAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCT
GTTCCGCTCCCCCGCCTACCGCCAGCCCATCCTCATCGCTGTGGTGCTGCAGCTGTCCCAGCAGCTGT
CTGGCATCAACGCTGTCTTCTATTACTCCACGAGCATCTTCGAGAAGGCGGGGGTGCAGCAGCCTGT
GTATGCCACCATTGGCTCCGGTATCGTCAACACGGCCTTCACTGTCGTGTCGCTGTTTGTGGTGGAG
CGAGCAGGCCGGCGGACCCTGCACCTCATAGGCCTCGCTGGCATGGCGGGTTGTGCCATACTCATG
ACCATCGCGCTAGCACTGCTGGAGCAGCTACCCTGGATGTCCTATCTGAGCATCGTGGCCATCTTTG
GCTTTGTGGCCTTCTTTGAAGTGGGTCCTGGCCCCATCCCATGGTTCATCGTGGCTGAACTCTTCAGC
CAGGGTCCACGTCCAGCTGCCATTGCCGTTGCAGGCTTCTCCAACTGGACCTCAAATTTCATTGTGG
GCATGTGCTTCCAGTATGTGGAGCAACTGTGTGGTCCCTACGTCTTCATCATCTTCACTGTGCTCCTG

图4

GTTCTGTTCTTCATCTTCACCTACTTCAAAGTTCCTGAGACTAAAGGCCGGACCTTCGATGAGATCGC
TTCCGGCTTCCGGCAGGGGGGAGCCAGCCAAAGTGACAAGACACCCGAGGAGCTGTTCCATCCCCT
GGGGGCTGATTCCCAAGTGTGATAATGGATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG
GTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTA
TTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTT
GTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTG
GGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGG
AACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGT
GGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCG
GGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCG
GCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTC
CCCGCATCATTGCCTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAG
TTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTG
TCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCCCAAGTTGGGAAGAAA
CCTGTAGGGCCTGCGTTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACATTTCTGCTCACTGCAACCTCCTCCTC
CCTGGGTTCtacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccctagtgatggagttggccactccctctc
tgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcga
gcgcgc

图4续

**hTie1-SLC2A1 – 4,258 bp**



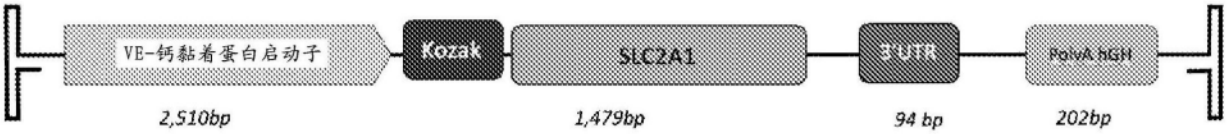

gcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgag
cgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtaCTCTG
GAGACGCGTTACATAAGCTCCTCCCAGCCTCAGGCCCAGGAATGGGAATCTCTGTGGGTCACACATC
AGTAGGGAGGTCTTTCCCGATCCTTTTCTATGCTACTCCAGGAGTCAAAGCGTCTCCTGGGACTTTTC
AGGGCGCTTCAGAAGAGCCCTGGGCCTAAACCAGCTCAACCAAGCTGCAGGGACCCAGCCTCCTGA
GAAAAGTGAATGTGAGCCCGGTGCATTCAGAGGAGAATGAAGCCTTCACCCAGAACACACTCTGGG
AAGATGTCCCAGGCCCAGGGGGAGGGTTTGTACTACCAGACCTAAGTCACCTAAACTGACACCAAG
TCTCATCCATCCCAACCATTCCATTCCGGGTCAGAGGGGTCATCGATTTAACCAGCAAGGCTGCCCAT
CCAACGGTTGCTCCCTCTGCTCCCTGGAAGGGCCTCCTCGTGGGCGTTCTGTACCTACAGGTCTTGTT
CCGTTCTGGGAACTGCCAGTGGTGGCAAGAGGTGGAGCAACGGGTGCCAGGGCAGGGAGAGGTG
AGTCTGGGAGGGAAGCAGAGGCAAGATCCATGGGGCTTTAGAGACTTTGCCAAAGCAGTGCGACT
GCTCCCAGGTTGTTGTCAGCCGTCAAGAGTGAGTGCACCTCCCTGGGCAGACTTCTGCTGCCCCAGT
GCCCAGGAATAGGCAGGGGTTTGCCGCAAAATGAATGACACCTGGCAGACAATAAGCTGAAGCTTT
CATTAGCAGCTTAAGCTGAGGACTATCTATGCAACCGATACTCCCTGTGTGCTCCCCGGGACTGCTTA
ATGTGAGCCCTTGTGGAGCGATTGGCACCAAGAAAGCAAGGACTAAGTCAGAAGTTCAAGTCCCAG
CCTTGCCACAGCCTCAGGGTGCCCTCGAGCACAGCAAGCCTCAGTTTTCCCATCTGTACAATGAGAG
AGGTACACAAGGTAGACTCGAAGGCTCTTTGTTGCCAGGGCCCTGTGTTCCTTTGAGTGTATGTGCT
TCTCAGGCCCACAGAGGTCCTTTGTGTTTCGTATGTGAACTGCTCTCTAGGAAACCCATGTAACTGTC
TGTGTCCTGGGGCACATACATGAGGACTCATGTGGGCCGTATTGTGTGTTTGTGCCGGGGGGAGGG
GAGACCCCAGAACAATGTCCCCCACCCCACCCCCCTCCTCAATAGGCGGAAGCCACTGGCTTCCTCCC
TTTCCTGCCTCCTGCCTCCTTTGTGCCAGCAAGACTGAGTACTGGAGAGAGACAGGGGATGGGAAA
AATCAGTCCAGCTGTCCCCAGGTCTGCCCTTACCATAACCTTCCCCCCACCTCAAGTGACTCCTCCCA
GGCCACACCCATCCCCAGCCTTGTGGGGGCCAGATTGGGGGGCCTAGAGGCTCAAAGGCAGAATG
AGTCCTCCCACCCCCTACCCTGCCACCCCTCCCACCCAAGCCACCTCATTTCCTCTTCCTCCCCAGCAC
CGACCCACACTGACCAACACAGGCTGAGCAGTCAGGCCCACAGCATCTGACCCCAGGCCCAGCTCG
TCCTGGCTGGCCTGGGTCGGCCTCTGGAGTGCCACCATGGAGCCCAGCAGCAAGAAGCTGACGGGT
CGCCTCATGCTGGCCGTGGGAGGAGCAGTGCTTGGCTCCCTGCAGTTTGGCTACAACACTGGAGTC
ATCAATGCCCCCCAGAAGGTGATCGAGGAGTTCTACAACCAGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAG
AGCATCCTGCCCACCACGCTCACCACGCTCTGGTCCCTCTCAGTGGCCATCTTTTCTGTTGGGGGCAT
GATTGGCTCCTTCTCTGTGGGCCTTTTCGTTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTCAATGCTGATGATGA
ACCTGCTGGCCTTCGTGTCCGCCGTGCTCATGGGCTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCT
GATCCTGGGCCGCTTCATCATCGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGTGCCCATGTATGTG
GGTGAAGTGTCACCCACAGCCCTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCGTC
GGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTCGGCCTGGACTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGTGGCCCCTGC
TGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGCCCTGCTGCAGTGCATCGTGCTGCCCTTCTGCCCCGAGAGTCCC
CGCTTCCTGCTCATCAACCGCAACGAGGAGAACCGGGCCAAGAGTGTGCTAAAGAAGCTGCGCGGG
ACAGCTGACGTGACCCATGACCTGCAGGAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCAGATGATGCGGGAGAA
GAAGGTCACCATCCTGGAGCTGTTCCGCTCCCCCGCCTACCGCCAGCCCATCCTCATCGCTGTGGTGC

图5

TGCAGCTGTCCCAGCAGCTGTCTGGCATCAACGCTGTCTTCTATTACTCCACGAGCATCTTCGAGAAG
GCGGGGGTGCAGCAGCCTGTGTATGCCACCATTGGCTCCGGTATCGTCAACACGGCCTTCACTGTCG
TGTCGCTGTTTGTGGTGGAGCGAGCAGGCCGGCGGACCCTGCACCTCATAGGCCTCGCTGGCATGG
CGGGTTGTGCCATACTCATGACCATCGCGCTAGCACTGCTGGAGCAGCTACCCTGGATGTCCTATCT
GAGCATCGTGGCCATCTTTGGCTTTGTGGCCTTCTTTGAAGTGGGTCCTGGCCCCATCCCATGGTTCA
TCGTGGCTGAACTCTTCAGCCAGGGTCCACGTCCAGCTGCCATTGCCGTTGCAGGCTTCTCCAACTG
GACCTCAAATTTCATTGTGGGCATGTGCTTCCAGTATGTGGAGCAACTGTGTGGTCCCTACGTCTTCA
TCATCTTCACTGTGCTCCTGGTTCTGTTCTTCATCTTCACCTACTTCAAAGTTCCTGAGACTAAAGGCC
GGACCTTCGATGAGATCGCTTCCGGCTTCCGGCAGGGGGGAGCCAGCCAAAGTGACAAGACACCCG
AGGAGCTGTTCCATCCCCTGGGGGCTGATTCCCAAGTGTGATAATGGATCAACCTCTGGATTACAAA
ATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTA
ATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGC
TGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGA
CGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCC
TCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTT
GGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTT
GCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCC
TTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGA
TCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCATTGCCTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTG
CCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCAT
CATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGG
GCCCAAGTTGGGAAGAAACCTGTAGGGCCTGCGTTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACATTTCTG
CTCACTGCAACCTCCTCCTCCCTGGGTTCtacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccct
agtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgc
ccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgc

图5续

**VE-Cadherin-SLC2A1 – 4,716 bp**



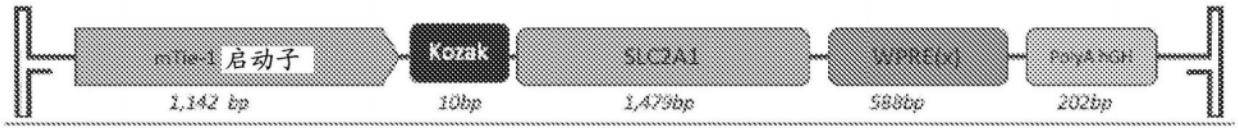

gcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgag
cgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtaCTCTG
GAGACGCGTTACATACTAGTAGCAGAAACAAGGTCCTCTGGAAGAGCAACTGATGCTCTTAGGTAC
TGAAGCATCATCCTGCCCCAGAGACCACTCGCATATGAAGCACACATATTCAGTCTGCCTTACTTGTG
TTAATGATTGCCAGTGTCCCTCTGACCTCCTAGCCCTGAAAAGTGTGGCCTGAAGGTCATTTCAGAG
ACGGGGAGAGCTGCTCAGAGAAGCCAATCGGCGAGTCTAGGACACACAGACAGGATCTAGTCCCA
GAGTTCGCTAGCCTAGGTGAGCGTCCCCTGGCCCCTTATACCACTTCCTTCTCCAGCTTGCATCTAAT
CTGCTCTGGCAGACCATCGTGTTTCCTGTCTTCCTGGCAGCCTCCAGCACGCTCAGTGCTACTCCCTG
CGCATGCGCCCTCCTCCCAGTACCTTCTCTGACTCCAGTGGGCTTGGAGTGCGAGGAGGAAGGGTG
AGGAAGGGGTGAAATCAGGTATTGGATCCACAGGGGGTCTGAAGAGCACTAGCCTGGCCTTTTGG
GACTGAACTTCTGCTATGAAGACCTCCACTGCCATCCCTGGAGTCCGGGGCACATCCAAGGCTTGCT
GTCCATCGTTTACTGTTTACAGATGACAACAATGACTGTGTTCGGGGCAGAAATATCCACCAGGGCT
AGAGTACAAAAGGAGTTTGCATTGATGGCCGGACAGGCCCTGTCCCTGGCAGCCTGCCAGCGCTGA
GTATGAGACCCAGCGGGAAGTGCTACCCTGGCAGACGTGTCCACTGAGTACACAGACCACCAAGGC
AGGCAGCTCTCGGGGAAGCTGTCTATGCTGGGCCAGCCCACCTTGAGGGCAGGGAACAGAACAGA
TTGTGGCAGAGAGGAAAATGTGGAGCTTCTGTTTGTTCACAGACACACGCACTCGCCCACGCACGC
ACGCACGCACGCACGCACGCACGAATGCACGCACGCAGTAGTTGAATGCTATGGATTCCGCTCAGA
GCTGAGAACAGCCCCAGCGACAGTTCCCTGGCCTCTCTCCTTACTCTGATGTCCTCATCTGTCTTCAC
ATGGTCTCAGGACGCTAATACTCCATCCTAATGTACACTCCTTTCCCTGGGCCTCCGTTCCAGTTCAGT
TCTCAGAGGACCTGGAGGGAGTGATTGGCTACACCAACTTTGCTTTCGTTCACCAAGCCCATGTCTCT
ACTTGGGTGTCTAATGGGCATCTCCAACATTACCTACCCCAAACAGAAAACCCTTTCTTCCCCCCAAC
CACACCCCACCCTACCCCCACAGTATTTTCTCCATGCCCGGAAAGATCTGCTCTCTTATGGTCCCTCTT
TGCCTCACTGAAAAGCAGGACAAGTTGGGGACTTCCCAAACTTTTATGCATGAAGAAACCCAGGCA
ATTTGCCAAAAGGTACACTCTGGGGGTCTGTCATTTACTCTGAGCCAGAACCCTGAAATTTTTACTAA
CCCATCACATAATGAATGAAGAGAATCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTGGTTTTTCGAGAC
AGGGTTTCTCTGTATAGCCCTGGCTATCCTGGAACACACTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCGAACTCA
GAAATCCACCTGCCTCTGCCTCCCGAGTGCTGGGATTAAAGGCGTGCGCCACCACGCCTGGCTGAAT
GAAGAGAATCTTGACCTCATCTCCCCAGCCTCTTGGTCCTGAGGGACCCTGGTCTACCTACTGCTTTG
CTGTCTTCTTAGCTCTTCTTACTTTTTTGCTGACTCAGACCTATGGCTATCTCCATTATACAGATGAGG
AGACTGAGGCATGGATCCCTGGTTGGTCCATGGTCACGTGAAGCCCATCACCCAGTATTTGTAAAGT
GAGATGGGCCAGGCTGGTACCTTGGAACTGAAACTCACACTGCCCTACCTGGAAGAATCTGACAGG
CAAAATCTGCTGCTGAAAGTGATTGTCTGTCACGTTTCTCAGCTGCCCGACTCTGAGAACTCCACAGC
CCCCTTTCGTTCCACCATACTACAGAGTCGCCACGGAAAGCCGGCTCTGTGGAGAAGCTGAGGTAGC
TGGGTTTCTGTCTGGGTTACTCTGTCCAGCGAGGAAACAAGTACCTTAGACCCACTAAGCCTCTGCTT
TCTGAACTGTAAAGTGGGGGATATGACACCTGCCTCCCAGGGATGGCTGAATGCTCTGGCAGAAGC
TTAGAGCCCCCACAGCTACCCCTAGGCTCACAGCTCCTCCGATGAGACCTAGAATTGAGGTATGAGT
TGAATACCCCAGGCAGGTCCAAGGCTTCCACGGGCCCAGGCTGACCAAGCTGAGGCCGCCCACCGT

图6

AGGGCTTGCCTATCTGCAGGCAGCTCACAAAGGAACAATAACAGGAAACCATCCCGAGGGGAAGT
GGGCCAGGGCCAGTTGGAAAACCTGCCTCCCTCCCAGCCTGGGTGTGGCTCCCCTCTCCCCTCCTGA
GGCAATCAACTGTGCTCTCCACAAAGCTCGGCCCTGGACAGACTGCCACCATGGAGCCCAGCAGCA
AGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCCGTGGGAGGAGCAGTGCTTGGCTCCCTGCAGTTTGGCT
ACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCCAGAAGGTGATCGAGGAGTTCTACAACCAGACATGGGTCC
ACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCCACCACGCTCACCACGCTCTGGTCCCTCTCAGTGGCCATCTTT
TCTGTTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGTGGGCCTTTTCGTTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTC
AATGCTGATGATGAACCTGCTGGCCTTCGTGTCCGCCGTGCTCATGGGCTTCTCGAAACTGGGCAAG
TCCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCCGCTTCATCATCGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGT
GCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTCACCCACAGCCCTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCT
GGGCATCGTCGTCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTCGGCCTGGACTCCATCATGGGCAACAAGGA
CCTGTGGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGCCCTGCTGCAGTGCATCGTGCTGCCCTTCT
GCCCCGAGAGTCCCCGCTTCCTGCTCATCAACCGCAACGAGGAGAACCGGGCCAAGAGTGTGCTAA
AGAAGCTGCGCGGGACAGCTGACGTGACCCATGACCTGCAGGAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCA
GATGATGCGGGAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCTGTTCCGCTCCCCCGCCTACCGCCAGCCCATC
CTCATCGCTGTGGTGCTGCAGCTGTCCCAGCAGCTGTCTGGCATCAACGCTGTCTTCTATTACTCCAC
GAGCATCTTCGAGAAGGCGGGGGTGCAGCAGCCTGTGTATGCCACCATTGGCTCCGGTATCGTCAA
CACGGCCTTCACTGTCGTGTCGCTGTTTGTGGTGGAGCGAGCAGGCCGGCGGACCCTGCACCTCATA
GGCCTCGCTGGCATGGCGGGTTGTGCCATACTCATGACCATCGCGCTAGCACTGCTGGAGCAGCTA
CCCTGGATGTCCTATCTGAGCATCGTGGCCATCTTTGGCTTTGTGGCCTTCTTTGAAGTGGGTCCTGG
CCCCATCCCATGGTTCATCGTGGCTGAACTCTTCAGCCAGGGTCCACGTCCAGCTGCCATTGCCGTTG
CAGGCTTCTCCAACTGGACCTCAAATTTCATTGTGGGCATGTGCTTCCAGTATGTGGAGCAACTGTGT
GGTCCCTACGTCTTCATCATCTTCACTGTGCTCCTGGTTCTGTTCTTCATCTTCACCTACTTCAAAGTTC
CTGAGACTAAAGGCCGGACCTTCGATGAGATCGCTTCCGGCTTCCGGCAGGGGGGAGCCAGCCAAA
GTGACAAGACACCCGAGGAGCTGTTCCATCCCCTGGGGGCTGATTCCCAAGTGTGAGCTGGAGCCT
CGGTAGCCGTTCCTCCTGCCCGCTGGGCCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCCTCCTTGCACCGGCCCTTC
CTGGTCTTTGAATAAACATTGCCTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGG
CCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCT
GACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCCCAAGTT
GGGAAGAAACCTGTAGGGCCTGCGTTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACATTTCTGCTCACTGCA
ACCTCCTCCTCCCTGGGTTCtacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccctagtgatggagtt
ggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctc
agtgagcgagcgagcgcgc

图6续

**mTie1-SLC2A1 – 3,850 bp**



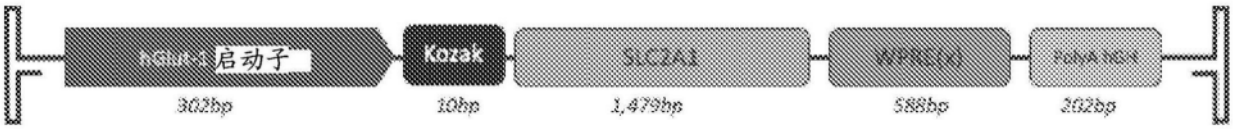

gcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgag
cgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtaCTCTG
GAGACGCGTTACATAAAGCTTCCGACCGTTAGTCAGAGAACTGTAAGTGCTCAGAGCCTGGCTGAC
AATGATCTGGAATGAACCAGATAACAACATAATAAAATCTCAGTAAAATAATTTAACAGTTAGCTTG
GAAGCTGGTCAGCTCTGGGGAAATCAGGGTAAATTGTGCTGTCATGAACTGTCCCACACTGACATC
GGCCAAAGTGAATATGAACTTTGGTAGATCCAATGCCTGTTCTATTTATTTTTCCAGTGAAAAGTATT
TTGATAGAGCTTTTCATTTTGTAAATACACTGAGTTAACCAAAATATCATGGATTTCCGTTTGTTCTTA
AGACATGCAACTCGTCTACGGCTATACCACTCTGAACGCGCCCGATCTCGGAAGACATGCAACTCAA
ATGTAAATACAGTAGAATATTACTTAGGTAGAAACTCCTGGTGATTTTAAAAGATTGGAAAAGAATA
TGAGGAAGAGTTGAATAATGCAAATTCTAGTGTGTGTGCTACCGAAGTGAACACTTAATGCACAGTC
TACAGACTAGGACATTTTATCGTGTGTTGTAAAATTGGGTAGAAACTTGTGTTTGTGAAAACTGAGC
ATTAAAACCTTACAGAGACCGTTTCTTGTTTACTTTTGAAAAAAAAAAGAGTCACGTGAGCCTCATTT
TGTATTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTCCCCTCCTCCCAGCGTGTGTGTGCTGGGAGGAGGGG
AGACCCCAGAACAATGTCCTGCCTCCAAACCTTCTCAATAGGCGGAAGCCACTGGCTTCCTCCCTTTC
CTGTCTCCCGTGCTCCAGCAATGCAGATGGAAGGGACCGAAGGGATGGGAGAGAGAGCCCAACCA
TCCCCAGATCTGTCCTTGTCACAACCTGCCTCCCACCTCTAATGCCCCCCCTTCCAGAGACTTCCAGGC
CACACCCATCCCGGGCTTGTGGGGGCTGGACACGGGAGGACTACAGGCGACAACTCTTCCCACCCT
CTCTCCCTGCCACCCCTCCTACCCTAACCATCATTTCCTCTTCCTCCCCAGCACCGAGGTGCACTGAGC
TGGACAGGCTGAACACTCAGACCCACAGCAACTGACCCCGGGCCCAGCTGGCCTTGGCTGGCCCAG
GGCAGCTTCCAGAGTGCCACCATGGAGCCCAGCAGCAAGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCC
GTGGGAGGAGCAGTGCTTGGCTCCCTGCAGTTTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCCAG
AAGGTGATCGAGGAGTTCTACAACCAGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCCACC
ACGCTCACCACGCTCTGGTCCCTCTCAGTGGCCATCTTTTCTGTTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTC
TGTGGGCCTTTTCGTTAACCGCTTTGGCCGGCGGAATTCAATGCTGATGATGAACCTGCTGGCCTTC
GTGTCCGCCGTGCTCATGGGCTTCTCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCCGCT
TCATCATCGGTGTGTACTGCGGCCTGACCACAGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTCACC
CACAGCCCTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCGTCGGCATCCTCATCGCC
CAGGTGTTCGGCCTGGACTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGTGGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCT
TCATCCCGGCCCTGCTGCAGTGCATCGTGCTGCCCTTCTGCCCCGAGAGTCCCCGCTTCCTGCTCATC
AACCGCAACGAGGAGAACCGGGCCAAGAGTGTGCTAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTGACGTGAC
CCATGACCTGCAGGAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCAGATGATGCGGGAGAAGAAGGTCACCATCC
TGGAGCTGTTCCGCTCCCCCGCCTACCGCCAGCCCATCCTCATCGCTGTGGTGCTGCAGCTGTCCCAG
CAGCTGTCTGGCATCAACGCTGTCTTCTATTACTCCACGAGCATCTTCGAGAAGGCGGGGGTGCAGC
AGCCTGTGTATGCCACCATTGGCTCCGGTATCGTCAACACGGCCTTCACTGTCGTGTCGCTGTTTGTG
GTGGAGCGAGCAGGCCGGCGGACCCTGCACCTCATAGGCCTCGCTGGCATGGCGGGTTGTGCCATA
CTCATGACCATCGCGCTAGCACTGCTGGAGCAGCTACCCTGGATGTCCTATCTGAGCATCGTGGCCA
TCTTTGGCTTTGTGGCCTTCTTTGAAGTGGGTCCTGGCCCCATCCCATGGTTCATCGTGGCTGAACTC

图7

TTCAGCCAGGGTCCACGTCCAGCTGCCATTGCCGTTGCAGGCTTCTCCAACTGGACCTCAAATTTCAT
TGTGGGCATGTGCTTCCAGTATGTGGAGCAACTGTGTGGTCCCTACGTCTTCATCATCTTCACTGTGC
TCCTGGTTCTGTTCTTCATCTTCACCTACTTCAAAGTTCCTGAGACTAAAGGCCGGACCTTCGATGAG
ATCGCTTCCGGCTTCCGGCAGGGGGGAGCCAGCCAAAGTGACAAGACACCCGAGGAGCTGTTCCAT
CCCCTGGGGGCTGATTCCCAAGTGTGATAATGGATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATT
GACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCA
TGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAG
GAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTG
GTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACG
GCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAAT
TCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGC
TGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCC
GCCTCCCCGCATCATTGCCTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCT
GGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACT
AGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCCCAAGTTGGGA
AGAAACCTGTAGGGCCTGCGTTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACATTTCTGCTCACTGCAACCTC
CTCCTCCCTGGGTTCtacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccctagtgatggagttggccac
tccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgag
cgagcgagcgcgc

图7续

**hGLUT-SLC2A1 – 3,010 bp**

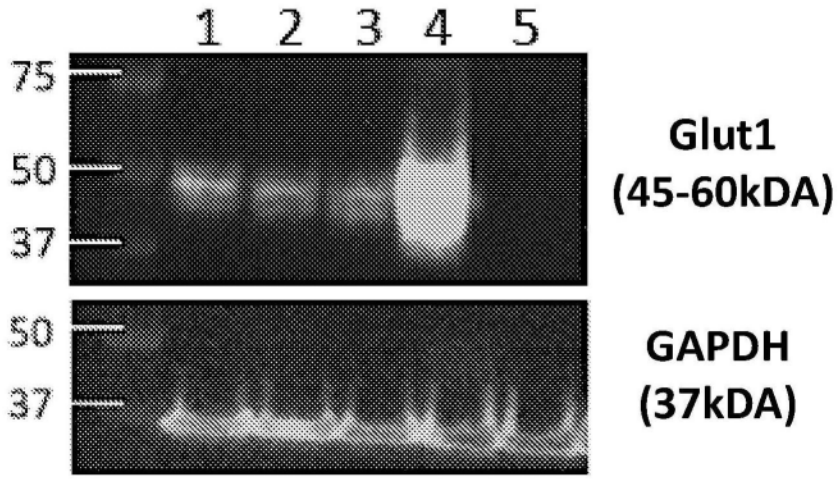



gcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgag
cgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtaCTCTG
GAGACGCGTTACATAACCATTTTGCTAGAGAAGGCCGCGGAGGCTCAGAGAGGTGCGCACACTTGC
CCTGAGTCACACAGCGAATGCCCTCCGCGGTCCCAACGCAGAGAGAACGAGCCGATCGGCAGCCTG
AGCGAGGCAGTGGTTAGGGGGGGCCCCGGCCCCGGCCACTCCCCTCACCCCCTCCCCGCAGAGCGC
CGCCCAGGACAGGCTGGGCCCCAGGCCCCGCCCCGAGGTCCTGCCCACACACCCCTGACACACCGG
CGTCGCCAGCCAATGGCCGGGGTCCTATAAACGCTACGGTCCGCGCGCTCTCTGCCACCATGGAGCC
CAGCAGCAAGAAGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCCGTGGGAGGAGCAGTGCTTGGCTCCCTGCA
GTTTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCCCCCCAGAAGGTGATCGAGGAGTTCTACAACCAGACA
TGGGTCCACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCCACCACGCTCACCACGCTCTGGTCCCTCTCAGTGG
CCATCTTTTCTGTTGGGGGCATGATTGGCTCCTTCTCTGTGGGCCTTTTCGTTAACCGCTTTGGCCGG
CGGAATTCAATGCTGATGATGAACCTGCTGGCCTTCGTGTCCGCCGTGCTCATGGGCTTCTCGAAAC
TGGGCAAGTCCTTTGAGATGCTGATCCTGGGCCGCTTCATCATCGGTGTGTACTGCGGCCTGACCAC
AGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTCACCCACAGCCCTTCGTGGGGCCCTGGGCACCCTG
CACCAGCTGGGCATCGTCGTCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTCGGCCTGGACTCCATCATGGGCA
ACAAGGACCTGTGGCCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGCCCTGCTGCAGTGCATCGTGCT
GCCCTTCTGCCCCGAGAGTCCCCGCTTCCTGCTCATCAACCGCAACGAGGAGAACCGGGCCAAGAGT
GTGCTAAAGAAGCTGCGCGGGACAGCTGACGTGACCCATGACCTGCAGGAGATGAAGGAAGAGAG
TCGGCAGATGATGCGGGAGAAGAAGGTCACCATCCTGGAGCTGTTCCGCTCCCCCGCCTACCGCCA
GCCCATCCTCATCGCTGTGGTGCTGCAGCTGTCCCAGCAGCTGTCTGGCATCAACGCTGTCTTCTATT
ACTCCACGAGCATCTTCGAGAAGGCGGGGGTGCAGCAGCCTGTGTATGCCACCATTGGCTCCGGTA
TCGTCAACACGGCCTTCACTGTCGTGTCGCTGTTTGTGGTGGAGCGAGCAGGCCGGCGGACCCTGC
ACCTCATAGGCCTCGCTGGCATGGCGGGTTGTGCCATACTCATGACCATCGCGCTAGCACTGCTGGA
GCAGCTACCCTGGATGTCCTATCTGAGCATCGTGGCCATCTTTGGCTTTGTGGCCTTCTTTGAAGTGG
GTCCTGGCCCCATCCCATGGTTCATCGTGGCTGAACTCTTCAGCCAGGGTCCACGTCCAGCTGCCATT
GCCGTTGCAGGCTTCTCCAACTGGACCTCAAATTTCATTGTGGGCATGTGCTTCCAGTATGTGGAGC
AACTGTGTGGTCCCTACGTCTTCATCATCTTCACTGTGCTCCTGGTTCTGTTCTTCATCTTCACCTACTT
CAAAGTTCCTGAGACTAAAGGCCGGACCTTCGATGAGATCGCTTCCGGCTTCCGGCAGGGGGGAGC
CAGCCAAAGTGACAAGACACCCGAGGAGCTGTTCCATCCCCTGGGGGCTGATTCCCAAGTGTGATA
ATGGATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTT
ACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTC
TCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG
CGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTC
CTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGC
TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCC
TTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTC
GGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTC
GCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCATTGCCTGCCCGGGTG

图8

GCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCC
TTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGG
AGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCCCAAGTTGGGAAGAAACCTGTAGGGCCTGCgttacccaggctg
gagtgcagtggcacatttctgctcactgcaacctcctcctccctgggttctacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaactac
aaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacg
cccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgc

图8续




18μg 蛋白/泳道

泳道 1 - AAV9-hFLT1-SLC2A1

泳道 2 - AAV9-mTIE1-SLC2A1

泳道 3 - AAV9-hGlut1-SLC2A1

泳道 4 - AAV9-CMV-SLC2A1

泳道 5 - 未转导对照

图9

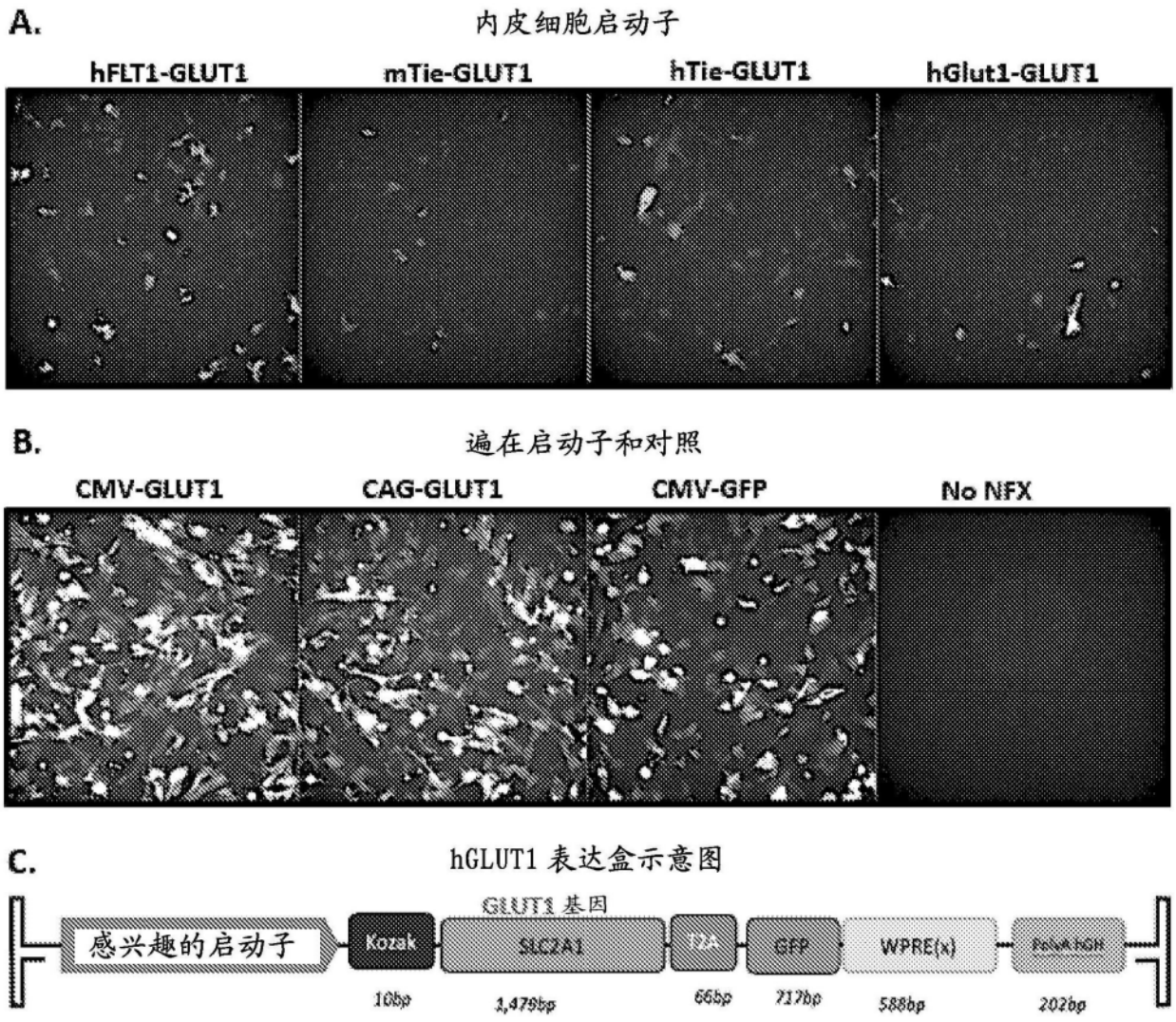

A.
内皮细胞启动子
hFLT1-GLUT1
mTie-GLUT1
hTie-GLUT1
hGlut1-GLUT1
B.
遍在启动子和对照
CMV-GLUT1
CAG-GLUT1
CMV-GFP
No NFX
C.
hGLUT1 表达盒示意图
GLUT1 基因
感兴趣的启动子
Kozak
SLC2A1
P2A
GFP
WPRE(x)
PolyA hGH
10bp
1,479bp
66bp
717bp
588bp
202bp

图10A-10C

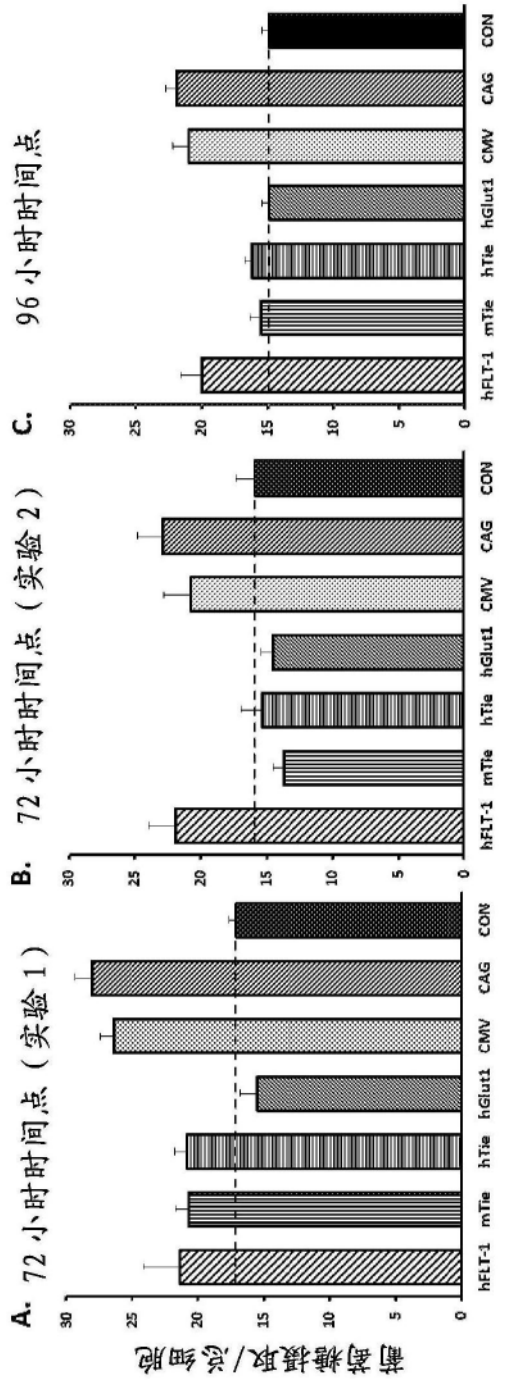

A. 72小时时间点（实验1）
B. 72小时时间点（实验2）
C. 96小时时间点
葡萄糖摄取/总细胞
0
5
10
15
20
25
30
hFLT-1
mTie
hTie
hGlut1
CMV
CAG
CON

图11A-11C

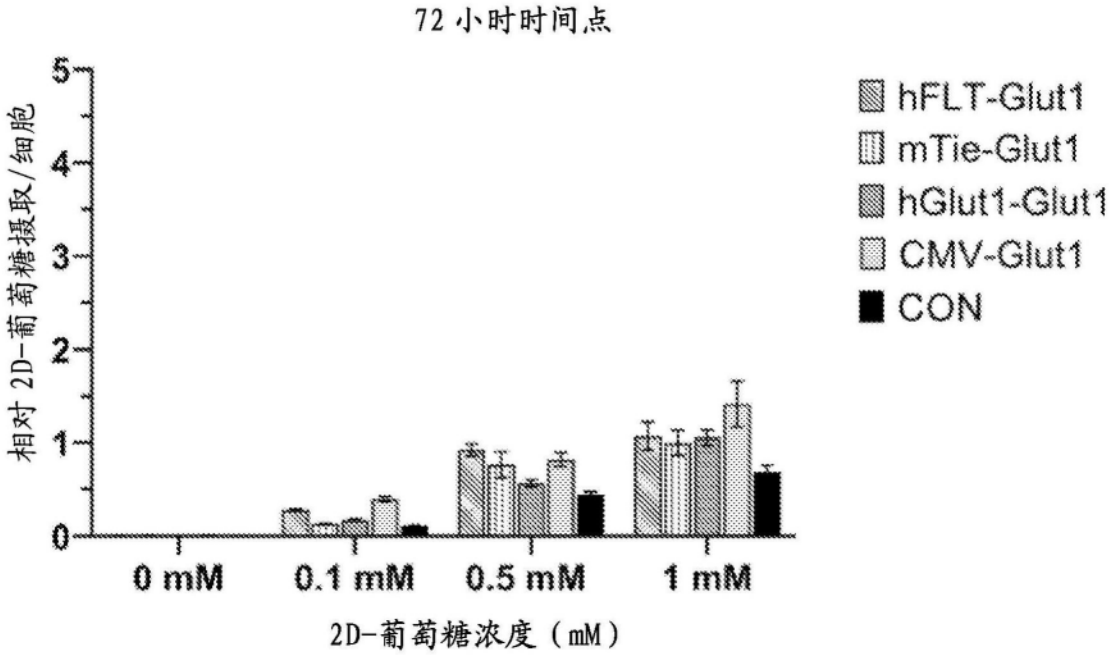

72 小时时间点
相对 2D-葡萄糖摄取/细胞
0
1
2
3
4
5
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
1 mM
2D-葡萄糖浓度（mM）
hFLT-Glut1
mTie-Glut1
hGlut1-Glut1
CMV-Glut1
CON

图12A

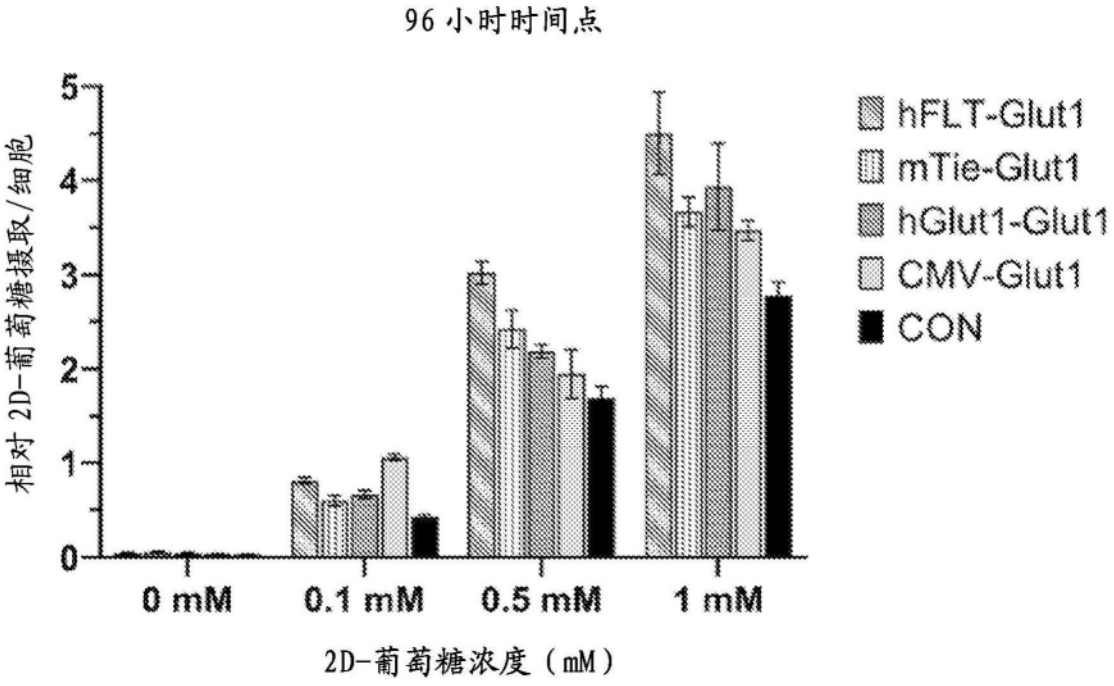

96 小时时间点
相对 2D-葡萄糖摄取/细胞
0
1
2
3
4
5
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
1 mM
2D-葡萄糖浓度（mM）
hFLT-Glut1
mTie-Glut1
hGlut1-Glut1
CMV-Glut1
CON

图12B

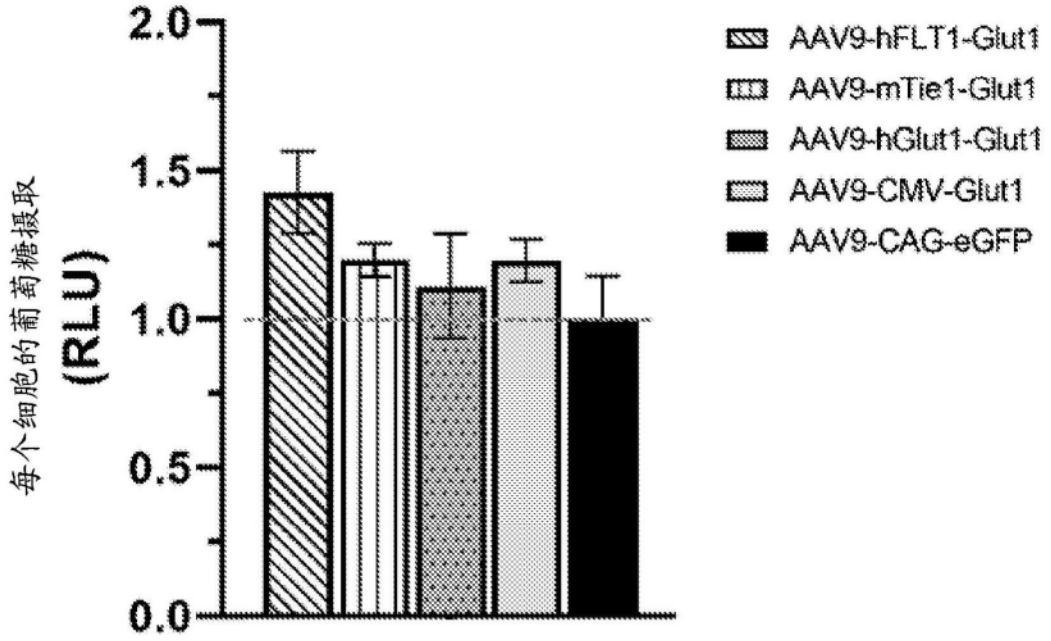

每个细胞的葡萄糖摄取
(RLU)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
AAV9-hFLT1-Glut1
AAV9-mTie1-Glut1
AAV9-hGlut1-Glut1
AAV9-CMV-Glut1
AAV9-CAG-eGFP

图13