(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118043474 A
(43)申请公布日 2024.05.14

(21)申请号 202280066122.3
(22)申请日 2022.07.27
(30)优先权数据
63/226,410 2021.07.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.03.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/038520 2022.07.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/009622 EN 2023.02.02
(71)申请人 阿特赛纳治疗公司
地址 美国北卡罗莱纳州
(72)发明人 克里斯托弗·科兹洛夫斯基
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 徐爱文 武晶晶
(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2018.01)
A61K 35/76(2015.01)
C07H 21/04(2006.01)

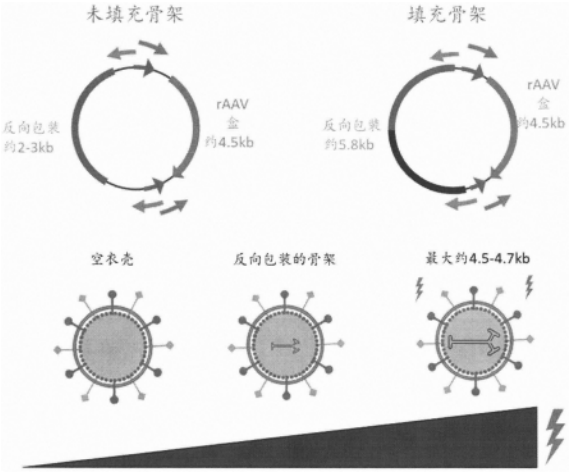
权利要求书4页 说明书93页
序列表（电子公布） 附图20页

(54)发明名称

AAV转移质粒

(57)摘要

本文公开了一种核酸填充序列,其包含一个或多个以下特征:没有CPG岛,和具有不超过四个相同身份的连续核碱基;其中该核酸填充序列不包括长度大于20个氨基酸的可读框。在一些实施方案中,核酸填充序列包含约40%至约50%的GC含量。在一些实施方案中,核酸填充序列不包含限制酶切割位点。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约100个核碱基至约5000个核碱基的长度。



CN 118043474 A

1.一种核酸填充序列,其包含一个或多个以下特征:没有CpG岛,和具有不超过四个相同身份的连续核碱基;其中所述核酸填充序列不包括长度大于20个氨基酸的可读框。

2.根据权利要求1所述的核酸填充序列,其不具有CpG岛。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的核酸填充序列,其具有不超过四个相同身份的连续核碱基。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的核酸填充序列,其包含约40%至约50%的GC含量。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列不包含限制酶切割位点。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列具有约100个核碱基至约5000个核碱基的长度。

7.根据权利要求6所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列具有约2200个核碱基至约2300个核碱基的长度。

8.根据权利要求6所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列具有约3000个核碱基至约3100个核碱基的长度。

9.根据权利要求6所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列具有约300个核碱基至约400个核碱基的长度。

10.根据权利要求1-6中任一项所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列包含与SEQ ID NO:7、8或11的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

11.一种核酸填充序列,其包含与SEQ ID NO:7的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

12.一种核酸填充序列,其包含与SEQ ID NO:8的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

13.一种核酸填充序列,其包含与SEQ ID NO:11的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

14.根据权利要求11-13中任一项所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列不包含CpG岛。

15.根据权利要求11-14中任一项所述的核酸序列,其中所述核酸填充序列包含不超过四个相同身份的连续核碱基。

16.根据权利要求11-15中任一项所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列包含约40%至约50%的GC含量。

17.根据权利要求11-16中任一项所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列不包含限制酶切割位点。

18.根据权利要求11-17中任一项所述的核酸填充序列,其中所述核酸填充序列具有约100至约5000个核碱基的长度。

19.一种腺相关病毒(AAV)质粒,其包含根据权利要求1-18中任一项所述的核酸填充序列。

20.根据权利要求19所述的AAV质粒,其中所述AAV质粒包含表达盒,所述表达盒包含位于两个反向末端重复(ITR)序列之间的异源序列。

21.根据权利要求20所述的AAV质粒,其中所述AAV质粒包含长度为约2000至约8000个核碱基的骨架。

22.根据权利要求21所述的AAV质粒,其中所述AAV质粒包含长度为约5500至约6000个核碱基的骨架。

23.根据权利要求20-22所述的AAV质粒,其中所述表达盒具有约3000至约6000个核碱基的长度。

24.根据权利要求23所述的AAV质粒,其中所述表达盒具有约4000个核碱基至约5000个核碱基的长度。

25.根据权利要求20-24中任一项所述的AAV质粒,其中所述异源序列编码治疗性肽。

26.根据权利要求25所述的AAV质粒,其中所述治疗性肽选自GUCY2D、MYO7A、RS1、CNBG3、ADAMTS10、ABCA4和共济蛋白。

27.根据权利要求19-26中任一项所述的AAV质粒,其包含抗生素抗性基因。

28.根据权利要求26所述的AAV质粒,其中所述抗生素抗性基因包含卡那霉素抗性基因。

29.根据权利要求19-26中任一项所述的AAV质粒,其中所述AAV质粒不包含抗生素抗性基因。

30.根据权利要求19-29中任一项所述的AAV质粒,其中所述AAV质粒不包含氨苄青霉素抗生素抗性基因。

31.根据权利要求19-30中任一项所述的AAV质粒,其中所述ITR衍生自AAV血清型1、AAV血清型2、AAV血清型3、AAV血清型4、AAV血清型5、AAV血清型6、AAV血清型7、AAV血清型8、AAV血清型9、AAV血清型10或AAV449.5(E531D)。

32.根据权利要求19-31中任一项所述的AAV质粒,其进一步包含启动子。

33.根据权利要求19-32中任一项所述的AAV质粒,其进一步包含剪接供体/剪接受体序列。

34.根据权利要求19-33中任一项所述的AAV质粒,其进一步包含WPRE序列。

35.根据权利要求20-34中任一项所述的AAV质粒,其中所述核酸填充序列位于所述表达盒的外部。

36.根据权利要求20-35中任一项所述的AAV质粒,其包含复制起点。

37.根据权利要求36所述的AAV质粒,其中所述核酸填充序列位于所述复制起点的3'。

38.根据权利要求36或权利要求37所述的AAV质粒,其中所述核酸填充序列位于所述复制起点与ITR之间。

39.根据权利要求38所述的AAV质粒,其中所述核酸填充序列被定位成使得所述ITR距离所述复制起点约1000至约4000个核碱基。

40.根据权利要求35-39中任一项所述的AAV质粒,其中所述核酸填充序列包含第一填充序列和第二填充序列。

41.根据权利要求40所述的AAV质粒,其中所述第一填充序列具有约3000至约3500个核碱基的长度。

42.根据权利要求40所述的AAV质粒,其中所述第一填充序列包含与SEQ ID NO:8的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

43.根据权利要求40所述的AAV质粒,其中所述第二填充序列具有约100至约500个核碱基的长度。

44.根据权利要求40所述的AAV质粒,其中所述第二填充序列包含与SEQ ID NO:11的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

45.根据权利要求20-44中任一项所述的AAV质粒,其中所述核酸填充序列位于所述表达盒内。

46.根据权利要求45所述的AAV质粒,其中所述核酸填充序列具有约2000至约3000个核碱基的长度。

47.根据权利要求44或45所述的AAV质粒,其中所述核酸填充序列包含与SEQ ID NO:7的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

48.根据权利要求19-47中任一项所述的AAV质粒,其中与不包含所述核酸填充序列的AAV质粒相比,所述核酸填充序列的存在减少ITR中的一者或两者的突变。

49.根据权利要求19-48中任一项所述的AAV质粒,其中所述AAV质粒具有不超过一个复制起点。

50.根据权利要求19-49中任一项所述的AAV质粒,其中所述AAV质粒不具有M13复制起点。

51.根据权利要求19-50中任一项所述的AAV质粒,其中所述AAV质粒不包含polyG/C序列。

52.根据权利要求19-51中任一项所述的AAV质粒,其中所述AAV质粒不包含具有超过2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续鸟嘌呤碱基的序列。

53.一种组合物,其包含根据权利要求19-52中任一项所述的AAV质粒和包含病毒复制(rep)基因和/或病毒衣壳(cap)基因的包装质粒。

54.根据权利要求53所述的组合物,其中所述包装质粒包含所述rep基因。

55.根据权利要求54所述的组合物,其中所述rep基因编码Rep78、Rep68、Rep52和Rep40。

56.根据权利要求53-55中任一项所述的组合物,其中所述包装质粒包含所述cap基因。

57.根据权利要求53-56中任一项所述的组合物,其中所述cap基因编码VP1、VP2和VP3。

58.根据权利要求57所述的组合物,其中所述cap基因包含与SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

59.根据权利要求53-58中任一项所述的组合物和辅助质粒。

60.一种组合物,其包含根据权利要求19-59中任一项所述的AAV质粒和辅助质粒。

61.根据权利要求59或权利要求60所述的组合物,其中所述辅助质粒包含E1a基因、E1b基因、E4基因、E2a、e3基因、E5基因、Fiber基因或VA基因或其组合。

62.根据权利要求61所述的组合物,其中所述辅助质粒包含突变的Fiber基因。

63.根据权利要求61所述的组合物,其中所述辅助质粒不包含Fiber基因。

64.一种细胞,其包含根据权利要求19-52中任一项所述的AAV质粒或根据权利要求53-63中任一项所述的组合物。

65.一种包含核酸和衣壳的AAV颗粒,其中所述AAV颗粒由根据权利要求19-52中任一项所述的AAV质粒、根据权利要求53-63中任一项所述的组合物或根据权利要求64所述的细胞产生。

66.一种药物组合物,其包含根据权利要求65所述的AAV颗粒和药学上可接受的载剂、缓冲剂、稀释剂或赋形剂或其任何组合。

67.一种用于转导细胞的方法,所述方法包括向所述细胞施用根据权利要求19-52中任一项所述的AAV载体、根据权利要求53-63中任一项所述的组合物、根据权利要求65所述的AAV颗粒或根据权利要求66所述的药物组合物。

68.根据权利要求64或权利要求67所述的方法,其中所述细胞是感光细胞。

69.根据权利要求68所述的方法,其中所述细胞是视网膜色素上皮(RPE)细胞。

70.根据权利要求68所述的方法,其中所述细胞是视网膜神经节细胞。

71.一种用于治疗哺乳动物的眼部疾病或病况的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用根据权利要求65所述的AAV颗粒或根据权利要求66所述的药物组合物。

72.根据权利要求71所述的方法,其中所述疾病或病况包括色素性视网膜炎、Leber先天性黑蒙(例如LCA10)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD、葡萄膜炎、Best病、Stargardt病、Usher综合征、地图样萎缩、糖尿病性视网膜病、视网膜劈裂、全色盲、无脉络膜症、Bardet Biedl综合征或糖原贮积病(眼部表现)。

73.根据权利要求71或72所述的方法,其中所述施用是施用于所述哺乳动物的一只或两只眼睛。

74.根据权利要求73所述的方法,其中所述AAV颗粒经玻璃体内或视网膜下施用。

75.根据权利要求1-18中任一项所述的核酸填充序列、根据权利要求19-52中任一项所述的AAV质粒、根据权利要求53-63中任一项所述的组合物、根据权利要求64所述的细胞、根据权利要求65所述的AAV颗粒或根据权利要求66所述的药物组合物,其用于治疗眼部疾病或病况。

76.根据权利要求1-18中任一项所述的核酸填充序列、根据权利要求19-52中任一项所述的AAV质粒、根据权利要求53-63中任一项所述的组合物、根据权利要求64所述的细胞、根据权利要求65所述的AAV颗粒或根据权利要求66所述的药物组合物在制备用于治疗眼部疾病或病况的药物中的用途。

AAV转移质粒

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2021年7月28日提交的美国临时申请号63/226,410的权益,该申请通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表援引并入

[0004] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表作为以58774-726_601_SL.XML命名的文件提供,创建于2022年7月25日,其大小为152千字节。电子格式的序列表中的信息通过引用整体并入。

发明内容

[0005] 在某些方面,本文公开了包含一个或多个以下特征的核酸填充序列:没有CpG岛和具有不超过四个相同身份的连续核碱基;其中该核酸填充序列不包括长度大于20个氨基酸的可读框。在一些实施方案中,核酸填充序列不具有CPG岛。在一些实施方案中,核酸填充序列具有不超过四个相同身份的连续核碱基。在一些实施方案中,核酸填充序列包含约40%至约50%的GC含量。在一些实施方案中,核酸填充序列不包含限制酶切割位点。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约100个核碱基至约5000个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约2200个核碱基至约2300个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约3000个核碱基至约3100个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约300个核碱基至约400个核碱基的长度。

[0006] 在一些实施方案中,核酸填充序列包含与SEQ ID NO:7、8或11的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些方面,本文公开了核酸填充序列,其包含与SEQ ID NO:7的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些方面,本文公开了核酸填充序列,其包含与SEQ ID NO:8的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些方面,本文公开了核酸填充序列,其包含与SEQ ID NO:11的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,核酸填充序列不包含CPG岛。在一些实施方案中,核酸填充序列包含不超过四个相同身份的连续核碱基。在一些实施方案中,核酸填充序列包含约40%至约50%的GC含量。在一些实施方案中,核酸填充序列不包含限制酶切割位点。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约100至约5000个核碱基的长度。在一些实施方案中,本文公开了包含本文公开的核酸填充序列的腺相关病毒(AAV)质粒。在一些实施方案中,AAV质粒进一步包含表达盒,该表达盒包含位于两个反向末端重复(ITR)序列之间的异源序列。在一些实施方案中,AAV质粒进一步包含长度为约2000至约8000个核碱基的骨架。在一些实施方案中,AAV质粒进一步包含长度为约5500至约6000

个核碱基的骨架。在一些实施方案中,表达盒具有约3000至约6000个核碱基的长度。在一些实施方案中,表达盒具有约4000至约5000个核碱基的长度。在一些实施方案中,异源序列编码治疗性肽。在一些实施方案中,治疗性肽选自GUCY2D、MYO7A、RS1、CNBG3、ADAMTS10、ABCA4和共济蛋白。在一些实施方案中,AAV质粒进一步包含抗生素抗性基因。在一些实施方案中,抗生素抗性基因包含卡那霉素抗性基因。在一些实施方案中,AAV质粒不包含抗生素抗性基因。在一些实施方案中,AAV质粒不包含氨苄青霉素抗生素抗性基因。在一些实施方案中,ITR衍生自AAV血清型1、AAV血清型2、AAV血清型3、AAV血清型4、AAV血清型5、AAV血清型6、AAV血清型7、AAV血清型8、AAV血清型9、AAV血清型10或AAV449.5(e531d)。在一些实施方案中,AAV质粒进一步包含启动子。在一些实施方案中,AAV质粒进一步包含剪接供体/剪接受体序列。在一些实施方案中,AAV质粒进一步包含WPRE序列。在一些实施方案中,核酸填充序列位于表达盒的外部。在一些实施方案中,AAV质粒进一步包含复制起点。在一些实施方案中,核酸填充序列位于复制起点的3'。在一些实施方案中,核酸填充序列位于复制起点与ITR之间。在一些实施方案中,核酸填充序列被定位成使得ITR距离复制起点约1000至约4000个核碱基。在一些实施方案中,核酸填充序列包含第一填充序列和第二填充序列。在一些实施方案中,第一填充序列具有约3000至约3500个核碱基的长度。在一些实施方案中,第一填充序列包含与SEQ ID NO:8的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,第二填充序列具有约100至约500个核碱基的长度。在一些实施方案中,第二填充序列包含与SEQ ID NO:11的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,核酸填充序列位于表达盒内。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约2000至约3000个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列包含与SEQ ID NO:7的至少100个连续碱基具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,与不包含核酸填充序列的AAV质粒相比,该核酸填充序列的存在减少ITR中的一者或两者的突变。在一些实施方案中,AAV质粒具有不超过一个复制起点。在一些实施方案中,AAV质粒不具有m13复制起点。在一些实施方案中,AAV质粒不包含polyG/C序列。在一些实施方案中,AAV质粒不包含具有超过2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续鸟嘌呤碱基的序列。

[0007] 在一些实施方案中,本文公开了包含本文公开的AAV质粒和包含病毒复制(rep)基因和/或病毒衣壳(cap)基因的包装质粒的组合物。在一些实施方案中,包装质粒包含rep基因。在一些实施方案中,rep基因编码rep78、rep68、rep52和rep40。在一些实施方案中,包装质粒包含cap基因。在一些实施方案中,cap基因编码vp 1、vp2和vp3。在一些实施方案中,cap基因包含与SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,组合物包含辅助质粒。

[0008] 在一些实施方案中,本文公开了包含本文所描述的AAV质粒和辅助质粒的组合物。在一些实施方案中,辅助质粒包含E1a基因、E1b基因、E4基因、E2a、e3基因、E5基因、Fiber基

因或VA基因或其组合。在一些实施方案中,辅助质粒包含突变的Fiber基因。在一些实施方案中,辅助质粒包含突变的Fiber基因。在一些实施方案中,辅助质粒不包含Fiber基因。

[0009] 在一些实施方案中,本文公开了包含本文公开的AAV质粒或本文公开的组合物的细胞。

[0010] 在一些实施方案中,本文公开了包含核酸和衣壳的AAV颗粒,其中AAV颗粒由本文公开的AAV质粒、本文公开的组合物或本文公开的细胞产生。在一些实施方案中,本文描述了包含本文公开的AAV颗粒和药学上可接受的载剂、缓冲剂、稀释剂或赋形剂或其任何组合的药物组合物。

[0011] 在一些实施方案中,本文公开了一种用于转导细胞的方法,该方法包括向细胞施用本文公开的AAV载体、本文公开的组合物、本文公开的AAV颗粒或本文公开的药物组合物。在一些实施方案中,细胞是感光细胞。在一些实施方案中,细胞是视网膜色素上皮(RPE)细胞。在一些实施方案中,细胞是视网膜神经节细胞。

[0012] 在一些实施方案中,本文公开了一种用于治疗哺乳动物的眼部疾病或病况的方法,所述方法包括向哺乳动物施用本文公开的AAV颗粒或本文公开的药物组合物。在一些实施方案中,疾病或病况包括色素性视网膜炎、Leber先天性黑蒙(例如LCA10)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD、葡萄膜炎、Best病、Stargardt病、Usher综合征、地图样萎缩、糖尿病性视网膜病、视网膜劈裂、全色盲、无脉络膜症、Bardet Biedl综合征或糖原贮积病(眼部表现)。在一些实施方案中,施用是施用于哺乳动物的一只或两只眼睛。在一些实施方案中,AAV颗粒经玻璃体内或视网膜下施用。

[0013] 在一些实施方案中,本文描述了本文公开的核酸填充序列、本文公开的AAV质粒、本文公开的组合物、本文公开的细胞、本文公开的AAV颗粒或本文公开的药物组合物,其用于治疗眼部疾病或病况。在一些实施方案中,本文公开了本文公开的核酸填充序列、本文公开的AAV质粒、本文公开的组合物、本文公开的细胞、本文公开的AAV颗粒或本文公开的药物组合物在制备用于治疗眼部疾病或病况的药物中的用途。

附图说明

[0014] 本发明的新颖特征在所附权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施例进行阐述的详细描述和附图,将获得对本发明的特征和优点的更好理解,其中:

[0015] 图1A描绘了用SmaI消化的AAV-骨架质粒的代表性实例。

[0016] 图1B描绘了在氨苄青霉素抗性细胞中生长并用SmaI消化的AAV骨架质粒。

[0017] 图1C描绘了在卡那霉素抗性细胞中生长并用SmaI消化的AAV骨架质粒。

[0018] 图2A描绘了在AAV质粒骨架中的polyG/C序列。

[0019] 图2B描绘了用SmaI消化的去除polyG/C序列的AAV骨架质粒。

[0020] 图3描绘了显示可导致AAV包装错误的不同过程的示意图。

[0021] 图4A描绘了具有位于起点3'的填充序列的AAV质粒骨架。

[0022] 图4B描绘了用SmaI消化的图4A的AAV骨架质粒。

[0023] 图5A描绘了具有位于起点5'的填充序列的AAV质粒骨架。

[0024] 图5B描绘了用SmaI消化的图5A的AAV骨架质粒。

[0025] 图6描绘了具有位于起点5′的填充序列和用SmaI消化的polyG/C序列的AAV质粒骨架。

[0026] 图7比较了在氨苄青霉素抗性细胞或卡那霉素抗性细胞中生长的AAV骨架质粒之间的ITR稳定性。

[0027] 图8A描绘了所使用的pTR-X002-3pSR转移质粒的示意图。

[0028] 图8B描绘了产生pTR-X002-3pSR转移质粒的过程。

[0029] 图8C描绘了Rep/Cap质粒的示意图。

[0030] 图8D描绘了辅助质粒的示意图。

[0031] 图9A-图9C显示了来自本公开的示例性载体的六个盒的示意图。示例性载体包括pTR-X001-3p,其具有从第一ITR的5’末端到第二ITR的3’末端的4534bp的长度(图9A),pTR-X001-5p,其具有从第一ITR的5’末端到第二ITR的3’末端的4528bp的长度(图9B),和pTR-X002-3p,其具有从第一ITR的5’末端到第二ITR的3’末端的4549bp的长度(图9C)。将pTR-GRK1-hRS1syn包装在AAV5和AAV.SPR中。将pTR-CBA-hRS1syn载体质粒(pTR-UF11骨架)包装在AAV5中以用作对照。

[0032] 图10显示用含有填充盒的rAAV.SPR处理的RS1KO小鼠中视网膜结构的恢复。用媒介物或含有以下盒:X001、X001-3p、X001-5p或X002-3P的rAAV.SPR载体处理的RS1KO小鼠中劈裂腔(schisis cavity)评分的定量。除了X001-5p在注射后的1个月之外,所有载体在两个时间点都改善了视网膜劈裂评分。用双因素ANOVA和Tukey后检验对经处理的眼睛确定标称描述性统计显著性。

[0033] 图11A-图11B显示用含有填充盒的rAAV.SPR处理的RS1KO小鼠中视网膜功能的恢复。在一只眼睛中视网膜下注射媒介物或含有以下盒:X001、X001-3p、X001-5p或X002-3P的rAAV.SPR后1个月和2个月测量RS1KO小鼠的平均最大暗视(左)和明视(右)b波振幅。载体以1×10^{8}个vg(图11A)或5×10^{8}个vg(图11B)给药。用所有载体处理的眼睛中的视网膜功能相对于未处理的对照眼睛得到改善。在每个单独的数据集上用双因素ANOVA和Tukey后检验确定标称描述性统计显著性。*P＜0.05,**P＜0.01,***P＜0.001,****P＜0.0001。

[0034] 图12A-图12B显示用rAAV.SPR-X002-3p处理的RS1KO小鼠视网膜中的RS1表达。来自在一只眼睛中仅用媒介物或含有X002-3p盒的rAAV.SPR处理的RS1KO小鼠的代表性视网膜横截面(顶部)。载体以1×10^{8}个vg(图12A)或5×10^{8}个vg(图12B)给药。对侧未处理的眼睛显示在底行中。所有视网膜都用针对RS1(红色)产生的抗体染色并用DAPI复染。

具体实施方式

[0035] I.物质的组成

[0036] 重组腺相关病毒(rAAV)载体已经成功地用于人类疾病的许多临床前动物模型中的体内基因转移,并且已经成功地用于多种治疗剂的长期表达。当靶向免疫豁免位点时,AAV载体也在人类中产生了长期临床益处,例如用于Leber先天性黑蒙的眼部递送。该载体的优点是其相对低的免疫谱,仅引起有限的炎症应答,并且在一些情况下,甚至指导对转基因产物的免疫耐受性。

[0037] 腺相关病毒(AAV)由于其效率、持久性和低免疫原性而用于眼部基因治疗。本公开的方面涉及重组腺相关病毒(rAAV)颗粒或此类颗粒的制剂,其用于将包含感兴趣的蛋白质

或多肽的一种或多种核酸载体递送到各种组织、器官和/或细胞中。

[0038] 本文描述了用于制造和包装AAV颗粒的改进的系统。在一些实施方案中,本文所描述的系统和方法提高包装AAV颗粒的效率,提高复制AAV颗粒或其组合的准确性。

[0039] A.填充序列

[0040] 在一些实施方案中,本文描述了核酸填充序列。如本文所描述,“填充序列”,可互换地称为“核酸填充序列”,可以是调整尺寸或将长度调节至或接近AAV病毒基因组序列正常长度的核酸序列。在一些实施方案中,核酸填充序列不包含CpG岛,核酸填充序列不包含超过四个相同身份的连续核碱基,核酸填充序列包含约40%至约50%的GC含量,核酸填充序列不包含限制酶切割位点,或核酸填充序列不编码大于20个氨基酸的可读框(open reading frame,ORF),或其组合。在一些实施方案中,该核酸填充序列不包含CpG岛,该核酸填充序列不包含超过四个相同身份的连续核碱基,该核酸填充序列包含约40%至约50%的GC含量,该核酸填充序列不编码大于20个氨基酸的可读框(ORF),并且该核酸填充序列不包含限制酶切割位点。

[0041] 在一些实施方案中,核酸填充物不包含CpG岛。在一些实施方案中,CpG岛(CGI)包含大量CpG二核苷酸重复。在一些实施方案中,CpG岛包含长度为至少100个碱基对的区域,其中GC含量超过50%GC。在一些实施方案中,CpG岛包含长度为至少100、200、300、400、500或更多个碱基对的区域。在一些实施方案中,CpG岛包含其中GC含量为至少50%、60%、70%、80%、90%或超过90%的区域。

[0042] 在一些实施方案中,核酸填充序列不包含超过3、4、5、6、7、8、9或10个相同身份的连续核碱基。在一些实施方案中,核酸填充序列不包含超过3、4、5、6、7、8、9或10个连续腺苷。在一些实施方案中,核酸填充序列不包含超过3、4、5、6、7、8、9或10个连续胞嘧啶。在一些实施方案中,核酸填充序列不包含超过3、4、5、6、7、8、9或10个连续鸟嘌呤。在一些实施方案中,核酸填充序列不包含超过3、4、5、6、7、8、9或10个连续胸腺嘧啶。

[0043] 在一些实施方案中,核酸填充序列包含约30%至约60%的GC含量。在一些实施方案中,核酸填充序列包含约40%至约50%的GC含量。在一些实施方案中,核酸填充序列包含约45%的GC含量。在一些实施方案中,核酸填充序列包含约0%至10%的GC含量、约5%至15%的GC含量、约10%至20%的GC含量、约15%至20%的GC含量、约25%至35%的GC含量、约30%至40%的GC含量、约35%至45%的GC含量、约40%至50%的GC含量、约45%至55%的GC含量、约50%至60%的GC含量、约55%至65%的GC含量、约60%至70%的GC含量、约65%至75%的GC含量、约70%至80%的GC含量、约75%至85%的GC含量、约80%至90%的GC含量、约85%至95%的GC含量或约05%至100%的GC含量。

[0044] 在一些实施方案中,核酸填充序列不包含限制酶切割位点。在一些实施方案中,限制酶切割位点是AatII、AbaSI、AccI、Acc65I、AciI、AclI、AcuI、AfeI、AflII、AflIII、AgeI§、**AgeI-HF®**、AhdI、AleI-v2、AluI、AlwI、AlwNI、ApaI、ApaLI、ApeKI、ApoI§、ApoI-HF、AscI、AseI、AsiSI、AVaI、AvaII、AvrII、BaeGI、BaeI、BamHI§、**BamHI-HF®**、BanI、BanII、BbsI§、**BbsI-HF®**、BbvCI、BbvI、BccI、BceAI、BcgI、BciVI、BclI§、BclI-HF、BcoDI、BfaI、BfuAI、BglI、BglII、BlpI、BmgBI、BmrI、BmtI§、**BmtI-HF®**、BpmI、BpuEI、Bpu10I、BsaAI、BsaBI、BsaHI、**BsaI-HF®v2**、BsaJI、BsaWI、BsaXI、BseRI、BseYI、BsgI、BsiEI、BsiHKAI、BsiWI§、**BsiWI-HF®**、BslI、BsmAI、BsmBI-v2、BsmFI、BsmI、BsoBI、BspCNI、BspDI、BspEI、BspHI、

Bsp 1286I、BspMI、BspQI、BsrBI、BsrDI、BsrFI-v2、BsrGI§、**BsrGI-HF®**、BsrI、BssHII、BssSI-v2、BstAPI、BstBI、BstEII§、**BstEII-HF®**、BstNI、BstUI、BstXI、BstYI、**BstZ17I-HF®**、Bsu36I、BtgI、BtgZI、BtsCI、BtsIMutI、BtsI-v2、Cac8I、ClaI、CspCI、CviAII、CviKI-1、CviQI、DdeI、DpnI、DpnII、DraI、**DraIII-HF®**、DrdI、EaeI、**EagI-HF®**、EarI、EciI、Eco53kI、EcoNI、Eco0109I、EcoP15I、EcoRI§、**EcoRI-HF®**、EcoRV§、**EcoRV-HF®**、Esp3I、FatI、FauI、Fnu4HI、FokI、FseI、FspEI、FspI、HaeII、HaeIII、HgaI、HhaI、HincII、HindIII§、**HindIII-HF®**、HinfI、HinP1I、HpaI、HpaII、HphI、HpyAV、HpyCH4III、HpyCH4IV、HpyCH4V、Hpy188I、Hpy99I、Hpy166II、Hpy188III、I-CeuI、I-SceI、KasI、KpnI§、**KpnI-HF®**、LpnPI、MboI、MboII、MfeI§、**MfeI-HF®**、MluCI、MluI§、**MluI-HF®**、MlyI、MmeI、MnlI、MscI、MseI、MslI、MspA1I、MspI、MspJI、MwoI、NaeI、NarI、Nb.BbvCI、Nb.BsmI、Nb.BsrDI、Nb.BssSI、Nb.BtsI、NciI、NcoI§、**NcoI-HF®**、NdeI、NgoMIV、**NheI-HF®**、NlaIII、NlaIV、NmeAIII、NotI§、**NotI-HF®**、NruI§、**NruI-HF®**、NsiI§、**NsiI-HF®**、NspI、Nt.AlwI、Nt.BbvCI、Nt.BsmAI、Nt.BspQI、Nt.BstNBI、Nt.CviPII、PacI、PaeR7I、PaqCI、PciI、Pfl FI、Pfl MI、PI-PspI、PI-SceI、PleI、PluTI、PmeI、PmlI、PpuMI、PshAI、PsiI-v2、PspGI、PspOMI、PspXI、PstI§、**PstI-HF®**、PvuI§、**PvuI-HF®**、PvuII§、**PvuII-HF®**、RsaI、RsrII、SacI§、**SacI-HF®**、SacII、SalI§、**SalI-HF®**、SapI、Sau3AI、Sau96I、SbfI§、**SbfI-HF®**、**ScaI-HF®**、ScrFI、SexAI、SfaNI、SfcI、SfiI、SfoI、SgrAI、SmaI、SmlI、SnaBI、SpeI§、**SpeI-HF®**、SphI§、**SphI-HF®**、SrfI、SspI§、SspI-**HF®**、StuI、StyD4I、**StyI-HF®**、SwaI、TaqI-v2、TfiI、Ts eI、Tsp45I、TspMI、TspRI、Tth111I、XbaI、XcmI、XhoI、XmaI、XmnI或ZraI限制性切割位点。

[0045] 在一些实施方案中,核酸填充物不编码大于10、20、30、40或50个氨基酸的可读框(ORF)。在一些实施方案中,核酸填充物不编码大于20个氨基酸的ORF。

[0046] 在一些实施方案中,核酸填充序列具有约100个核碱基至约5000个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约100至约5000、100至约4000、100至约3000、100至约2000、100至约1000、100至约900、100至约800、100至约700、100至约600、100至约500或100至约400个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约100至约5000、500至约5000、1000至约5000、2000至约5000或3000至约5000个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约1000至约5000、1050至约4500或2000至约3000个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约3028个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约2235个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约381个核碱基的长度。

[0047] 在一些实施方案中,核酸填充序列包含与SEQ ID NO:7具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,核酸填充序列包含与SEQ ID NO:8具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,核酸填充序列包含与SEQ ID NO:11具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序

列。在一些实施方案中,核酸填充序列包含与SEQ ID NO:7、8或11的100个核苷酸约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0048] 在一些实施方案中,核酸填充序列包含与与SEQ ID NO:7互补的序列具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,核酸填充序列包含与与SEQ ID NO:8互补的序列具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,核酸填充序列包含与与SEQ ID NO:11互补的序列具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,核酸填充序列包含与与SEQ ID NO:7、8或11的至少100个核苷酸互补的序列约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0049] 在一些实施方案中,核酸填充序列包含与SEQ ID NO:7或与SEQ ID NO:7互补的序列的碱基1-100、2-101、3-102、4-103、5-104、6-105、7-106、8-107、9-108、10-109、11-110、12-111、13-112、14-113、15-114、16-115、17-116、18-117、19-118、20-119、21-120、22-121、23-122、24-123、25-124、26-125、27-126、28-127、29-128、30-129、31-130、32-131、33-132、34-133、35-134、36-135、37-136、38-137、39-138、40-139、41-140、42-141、43-142、44-143、45-144、46-145、47-146、48-147、49-148、50-149、51-150、52-151、53-152、54-153、55-154、56-155、57-156、58-157、59-158、60-159、61-160、62-161、63-162、64-163、65-164、66-165、67-166、68-167、69-168、70-169、71-170、72-171、73-172、74-173、75-174、76-175、77-176、78-177、79-178、80-179、81-180、82-181、83-182、84-183、85-184、86-185、87-186、88-187、89-188、90-189、91-190、92-191、93-192、94-193、95-194、96-195、97-196、98-197、99-198、100-199、101-200、102-201、103-202、104-203、105-204、106-205、107-206、108-207、109-208、110-209、111-210、112-211、113-212、114-213、115-214、116-215、117-216、118-217、119-218、120-219、121-220、122-221、123-222、124-223、125-224、126-225、127-226、128-227、129-228、130-229、131-230、132-231、133-232、134-233、135-234、136-235、137-236、138-237、139-238、140-239、141-240、142-241、143-242、144-243、145-244、146-245、147-246、148-247、149-248、150-249、151-250、152-251、153-252、154-253、155-254、156-255、157-256、158-257、159-258、160-259、161-260、162-261、163-262、164-263、165-264、166-265、167-266、168-267、169-268、170-269、171-270、172-271、173-272、174-273、175-274、176-275、177-276、178-277、179-278、180-279、181-280、182-281、183-282、184-283、185-284、186-285、187-286、188-287、189-288、190-289、191-290、192-291、193-292、194-293、195-294、196-295、197-296、198-297、199-298、200-299、201-300、202-301、203-302、204-303、205-304、206-305、207-306、208-307、209-308、210-309、211-310、212-311、213-312、214-313、215-314、216-315、217-316、218-317、219-318、220-319、221-320、222-321、223-322、224-323、225-324、226-325、227-326、228-327、229-328、230-329、231-330、232-331、233-332、234-333、235-334、236-335、237-336、238-337、239-338、240-339、241-340、242-

341、243-342、244-343、245-344、246-345、247-346、248-347、249-348、250-349、251-350、252-351、253-352、254-353、255-354、256-355、257-356、258-357、259-358、260-359、261-360、262-361、263-362、264-363、265-364、266-365、267-366、268-367、269-368、270-369、271-370、272-371、273-372、274-373、275-374、276-375、277-376、278-377、279-378、280-379、281-380、282-381、283-382、284-383、285-384、286-385、287-386、288-387、289-388、290-389、291-390、292-391、293-392、294-393、295-394、296-395、297-396、298-397、299-398、300-399、301-400、302-401、303-402、304-403、305-404、306-405、307-406、308-407、309-408、310-409、311-410、312-411、313-412、314-413、315-414、316-415、317-416、318-417、319-418、320-419、321-420、322-421、323-422、324-423、325-424、326-425、327-426、328-427、329-428、330-429、331-430、332-431、333-432、334-433、335-434、336-435、337-436、338-437、339-438、340-439、341-440、342-441、343-442、344-443、345-444、346-445、347-446、348-447、349-448、350-449、351-450、352-451、353-452、354-453、355-454、356-455、357-456、358-457、359-458、360-459、361-460、362-461、363-462、364-463、365-464、366-465、367-466、368-467、369-468、370-469、371-470、372-471、373-472、374-473、375-474、376-475、377-476、378-477、379-478、380-479、381-480、382-481、383-482、384-483、385-484、386-485、387-486、388-487、389-488、390-489、391-490、392-491、393-492、394-493、395-494、396-495、397-496、398-497、399-498、400-499、401-500、402-501、403-502、404-503、405-504、406-505、407-506、408-507、409-508、410-509、411-510、412-511、413-512、414-513、415-514、416-515、417-516、418-517、419-518、420-519、421-520、422-521、423-522、424-523、425-524、426-525、427-526、428-527、429-528、430-529、431-530、432-531、433-532、434-533、435-534、436-535、437-536、438-537、439-538、440-539、441-540、442-541、443-542、444-543、445-544、446-545、447-546、448-547、449-548、450-549、451-550、452-551、453-552、454-553、455-554、456-555、457-556、458-557、459-558、460-559、461-560、462-561、463-562、464-563、465-564、466-565、467-566、468-567、469-568、470-569、471-570、472-571、473-572、474-573、475-574、476-575、477-576、478-577、479-578、480-579、481-580、482-581、483-582、484-583、485-584、486-585、487-586、488-587、489-588、490-589、491-590、492-591、493-592、494-593、495-594、496-595、497-596、498-597、499-598、500-599、501-600、502-601、503-602、504-603、505-604、506-605、507-606、508-607、509-608、510-609、511-610、512-611、513-612、514-613、515-614、516-615、517-616、518-617、519-618、520-619、521-620、522-621、523-622、524-623、525-624、526-625、527-626、528-627、529-628、530-629、531-630、532-631、533-632、534-633、535-634、536-635、537-636、538-637、539-638、540-639、541-640、542-641、543-642、544-643、545-644、546-645、547-646、548-647、549-648、550-649、551-650、552-651、553-652、554-653、555-654、556-655、557-656、558-657、559-658、560-659、561-660、562-661、563-662、564-663、565-664、566-665、567-666、568-667、569-668、570-669、571-670、572-671、573-672、574-673、575-674、576-675、577-676、578-677、579-678、580-679、581-680、582-681、583-682、584-683、585-684、586-685、587-686、588-687、589-688、590-689、591-690、592-691、593-692、594-693、595-694、596-695、597-696、598-697、599-698、600-699、601-700、602-701、603-702、604-703、605-704、606-705、607-706、608-707、609-708、610-709、611-710、612-711、

613-712、614-713、615-714、616-715、617-716、618-717、619-718、620-719、621-720、622-721、623-722、624-723、625-724、626-725、627-726、628-727、629-728、630-729、631-730、632-731、633-732、634-733、635-734、636-735、637-736、638-737、639-738、640-739、641-740、642-741、643-742、644-743、645-744、646-745、647-746、648-747、649-748、650-749、651-750、652-751、653-752、654-753、655-754、656-755、657-756、658-757、659-758、660-759、661-760、662-761、663-762、664-763、665-764、666-765、667-766、668-767、669-768、670-769、671-770、672-771、673-772、674-773、675-774、676-775、677-776、678-777、679-778、680-779、681-780、682-781、683-782、684-783、685-784、686-785、687-786、688-787、689-788、690-789、691-790、692-791、693-792、694-793、695-794、696-795、697-796、698-797、699-798、700-799、701-800、702-801、703-802、704-803、705-804、706-805、707-806、708-807、709-808、710-809、711-810、712-811、713-812、714-813、715-814、716-815、717-816、718-817、719-818、720-819、721-820、722-821、723-822、724-823、725-824、726-825、727-826、728-827、729-828、730-829、731-830、732-831、733-832、734-833、735-834、736-835、737-836、738-837、739-838、740-839、741-840、742-841、743-842、744-843、745-844、746-845、747-846、748-847、749-848、750-849、751-850、752-851、753-852、754-853、755-854、756-855、757-856、758-857、759-858、760-859、761-860、762-861、763-862、764-863、765-864、766-865、767-866、768-867、769-868、770-869、771-870、772-871、773-872、774-873、775-874、776-875、777-876、778-877、779-878、780-879、781-880、782-881、783-882、784-883、785-884、786-885、787-886、788-887、789-888、790-889、791-890、792-891、793-892、794-893、795-894、796-895、797-896、798-897、799-898、800-899、801-900、802-901、803-902、804-903、805-904、806-905、807-906、808-907、809-908、810-909、811-910、812-911、813-912、814-913、815-914、816-915、817-916、818-917、819-918、820-919、821-920、822-921、823-922、824-923、825-924、826-925、827-926、828-927、829-928、830-929、831-930、832-931、833-932、834-933、835-934、836-935、837-936、838-937、839-938、840-939、841-940、842-941、843-942、844-943、845-944、846-945、847-946、848-947、849-948、850-949、851-950、852-951、853-952、854-953、855-954、856-955、857-956、858-957、859-958、860-959、861-960、862-961、863-962、864-963、865-964、866-965、867-966、868-967、869-968、870-969、871-970、872-971、873-972、874-973、875-974、876-975、877-976、878-977、879-978、880-979、881-980、882-981、883-982、884-983、885-984、886-985、887-986、888-987、889-988、890-989、891-990、892-991、893-992、894-993、895-994、896-995、897-996、898-997、899-998、900-999、901-1000、902-1001、903-1002、904-1003、905-1004、906-1005、907-1006、908-1007、909-1008、910-1009、911-1010、912-1011、913-1012、914-1013、915-1014、916-1015、917-1016、918-1017、919-1018、920-1019、921-1020、922-1021、923-1022、924-1023、925-1024、926-1025、927-1026、928-1027、929-1028、930-1029、931-1030、932-1031、933-1032、934-1033、935-1034、936-1035、937-1036、938-1037、939-1038、940-1039、941-1040、942-1041、943-1042、944-1043、945-1044、946-1045、947-1046、948-1047、949-1048、950-1049、951-1050、952-1051、953-1052、954-1053、955-1054、956-1055、957-1056、958-1057、959-1058、960-1059、961-1060、962-1061、963-1062、964-1063、965-1064、966-1065、967-1066、968-1067、969-1068、970-1069、971-1070、972-1071、973-1072、974-

1073、975-1074、976-1075、977-1076、978-1077、979-1078、980-1079、981-1080、982-1081、983-1082、984-1083、985-1084、986-1085、987-1086、988-1087、989-1088、990-1089、991-1090、992-1091、993-1092、994-1093、995-1094、996-1095、997-1096、998-1097、999-1098、1000-1099、1000-1100、1001-1101、1002-1102、1003-1103、1004-1104、1005-1105、1006-1106、1007-1107、1008-1108、1009-1109、1010-1110、1011-1111、1012-1112、1013-1113、1014-1114、1015-1115、1016-1116、1017-1117、1018-1118、1019-1119、1020-1120、1021-1121、1022-1122、1023-1123、1024-1124、1025-1125、1026-1126、1027-1127、1028-1128、1029-1129、1030-1130、1031-1131、1032-1132、1033-1133、1034-1134、1035-1135、1036-1136、1037-1137、1038-1138、1039-1139、1040-1140、1041-1141、1042-1142、1043-1143、1044-1144、1045-1145、1046-1146、1047-1147、1048-1148、1049-1149、1050-1150、1051-1151、1052-1152、1053-1153、1054-1154、1055-1155、1056-1156、1057-1157、1058-1158、1059-1159、1060-1160、1061-1161、1062-1162、1063-1163、1064-1164、1065-1165、1066-1166、1067-1167、1068-1168、1069-1169、1070-1170、1071-1171、1072-1172、1073-1173、1074-1174、1075-1175、1076-1176、1077-1177、1078-1178、1079-1179、1080-1180、1081-1181、1082-1182、1083-1183、1084-1184、1085-1185、1086-1186、1087-1187、1088-1188、1089-1189、1090-1190、1091-1191、1092-1192、1093-1193、1094-1194、1095-1195、1096-1196、1097-1197、1098-1198、1099-1199、1100-1200、1101-1201、1102-1202、1103-1203、1104-1204、1105-1205、1106-1206、1107-1207、1108-1208、1109-1209、1110-1210、1111-1211、1112-1212、1113-1213、1114-1214、1115-1215、1116-1216、1117-1217、1118-1218、1119-1219、1120-1220、1121-1221、1122-1222、1123-1223、1124-1224、1125-1225、1126-1226、1127-1227、1128-1228、1129-1229、1130-1230、1131-1231、1132-1232、1133-1233、1134-1234、1135-1235、1136-1236、1137-1237、1138-1238、1139-1239、1140-1240、1141-1241、1142-1242、1143-1243、1144-1244、1145-1245、1146-1246、1147-1247、1148-1248、1149-1249、1150-1250、1151-1251、1152-1252、1153-1253、1154-1254、1155-1255、1156-1256、1157-1257、1158-1258、1159-1259、1160-1260、1161-1261、1162-1262、1163-1263、1164-1264、1165-1265、1166-1266、1167-1267、1168-1268、1169-1269、1170-1270、1171-1271、1172-1272、1173-1273、1174-1274、1175-1275、1176-1276、1177-1277、1178-1278、1179-1279、1180-1280、1181-1281、1182-1282、1183-1283、1184-1284、1185-1285、1186-1286、1187-1287、1188-1288、1189-1289、1190-1290、1191-1291、1192-1292、1193-1293、1194-1294、1195-1295、1196-1296、1197-1297、1198-1298、1199-1299、1200-1300、1201-1301、1202-1302、1203-1303、1204-1304、1205-1305、1206-1306、1207-1307、1208-1308、1209-1309、1210-1310、1211-1311、1212-1312、1213-1313、1214-1314、1215-1315、1216-1316、1217-1317、1218-1318、1219-1319、1220-1320、1221-1321、1222-1322、1223-1323、1224-1324、1225-1325、1226-1326、1227-1327、1228-1328、1229-1329、1230-1330、1231-1331、1232-1332、1233-1333、1234-1334、1235-1335、1236-1336、1237-1337、1238-1338、1239-1339、1240-1340、1241-1341、1242-1342、1243-1343、1244-1344、1245-1345、1246-1346、1247-1347、1248-1348、1249-1349、1250-1350、1251-1351、1252-1352、1253-1353、1254-1354、1255-1355、1256-1356、1257-1357、1258-1358、1259-1359、1260-1360、1261-1361、1262-1362、1263-1363、1264-1364、1265-1365、1266-1366、1267-1367、1268-1368、

1269-1369、1270-1370、1271-1371、1272-1372、1273-1373、1274-1374、1275-1375、1276-1376、1277-1377、1278-1378、1279-1379、1280-1380、1281-1381、1282-1382、1283-1383、1284-1384、1285-1385、1286-1386、1287-1387、1288-1388、1289-1389、1290-1390、1291-1391、1292-1392、1293-1393、1294-1394、1295-1395、1296-1396、1297-1397、1298-1398、1299-1399、1300-1400、1301-1401、1302-1402、1303-1403、1304-1404、1305-1405、1306-1406、1307-1407、1308-1408、1309-1409、1310-1410、1311-1411、1312-1412、1313-1413、1314-1414、1315-1415、1316-1416、1317-1417、1318-1418、1319-1419、1320-1420、1321-1421、1322-1422、1323-1423、1324-1424、1325-1425、1326-1426、1327-1427、1328-1428、1329-1429、1330-1430、1331-1431、1332-1432、1333-1433、1334-1434、1335-1435、1336-1436、1337-1437、1338-1438、1339-1439、1340-1440、1341-1441、1342-1442、1343-1443、1344-1444、1345-1445、1346-1446、1347-1447、1348-1448、1349-1449、1350-1450、1351-1451、1352-1452、1353-1453、1354-1454、1355-1455、1356-1456、1357-1457、1358-1458、1359-1459、1360-1460、1361-1461、1362-1462、1363-1463、1364-1464、1365-1465、1366-1466、1367-1467、1368-1468、1369-1469、1370-1470、1371-1471、1372-1472、1373-1473、1374-1474、1375-1475、1376-1476、1377-1477、1378-1478、1379-1479、1380-1480、1381-1481、1382-1482、1383-1483、1384-1484、1385-1485、1386-1486、1387-1487、1388-1488、1389-1489、1390-1490、1391-1491、1392-1492、1393-1493、1394-1494、1395-1495、1396-1496、1397-1497、1398-1498、1399-1499、1400-1500、1401-1501、1402-1502、1403-1503、1404-1504、1405-1505、1406-1506、1407-1507、1408-1508、1409-1509、1410-1510、1411-1511、1412-1512、1413-1513、1414-1514、1415-1515、1416-1516、1417-1517、1418-1518、1419-1519、1420-1520、1421-1521、1422-1522、1423-1523、1424-1524、1425-1525、1426-1526、1427-1527、1428-1528、1429-1529、1430-1530、1431-1531、1432-1532、1433-1533、1434-1534、1435-1535、1436-1536、1437-1537、1438-1538、1439-1539、1440-1540、1441-1541、1442-1542、1443-1543、1444-1544、1445-1545、1446-1546、1447-1547、1448-1548、1449-1549、1450-1550、1451-1551、1452-1552、1453-1553、1454-1554、1455-1555、1456-1556、1457-1557、1458-1558、1459-1559、1460-1560、1461-1561、1462-1562、1463-1563、1464-1564、1465-1565、1466-1566、1467-1567、1468-1568、1469-1569、1470-1570、1471-1571、1472-1572、1473-1573、1474-1574、1475-1575、1476-1576、1477-1577、1478-1578、1479-1579、1480-1580、1481-1581、1482-1582、1483-1583、1484-1584、1485-1585、1486-1586、1487-1587、1488-1588、1489-1589、1490-1590、1491-1591、1492-1592、1493-1593、1494-1594、1495-1595、1496-1596、1497-1597、1498-1598、1499-1599、1500-1600、1501-1601、1502-1602、1503-1603、1504-1604、1505-1605、1506-1606、1507-1607、1508-1608、1509-1609、1510-1610、1511-1611、1512-1612、1513-1613、1514-1614、1515-1615、1516-1616、1517-1617、1518-1618、1519-1619、1520-1620、1521-1621、1522-1622、1523-1623、1524-1624、1525-1625、1526-1626、1527-1627、1528-1628、1529-1629、1530-1630、1531-1631、1532-1632、1533-1633、1534-1634、1535-1635、1536-1636、1537-1637、1538-1638、1539-1639、1540-1640、1541-1641、1542-1642、1543-1643、1544-1644、1545-1645、1546-1646、1547-1647、1548-1648、1549-1649、1550-1650、1551-1651、1552-1652、1553-1653、1554-1654、1555-1655、1556-1656、1557-1657、1558-1658、1559-1659、1560-1660、1561-

1661、1562-1662、1563-1663、1564-1664、1565-1665、1566-1666、1567-1667、1568-1668、1569-1669、1570-1670、1571-1671、1572-1672、1573-1673、1574-1674、1575-1675、1576-1676、1577-1677、1578-1678、1579-1679、1580-1680、1581-1681、1582-1682、1583-1683、1584-1684、1585-1685、1586-1686、1587-1687、1588-1688、1589-1689、1590-1690、1591-1691、1592-1692、1593-1693、1594-1694、1595-1695、1596-1696、1597-1697、1598-1698、1599-1699、1600-1700、1601-1701、1602-1702、1603-1703、1604-1704、1605-1705、1606-1706、1607-1707、1608-1708、1609-1709、1610-1710、1611-1711、1612-1712、1613-1713、1614-1714、1615-1715、1616-1716、1617-1717、1618-1718、1619-1719、1620-1720、1621-1721、1622-1722、1623-1723、1624-1724、1625-1725、1626-1726、1627-1727、1628-1728、1629-1729、1630-1730、1631-1731、1632-1732、1633-1733、1634-1734、1635-1735、1636-1736、1637-1737、1638-1738、1639-1739、1640-1740、1641-1741、1642-1742、1643-1743、1644-1744、1645-1745、1646-1746、1647-1747、1648-1748、1649-1749、1650-1750、1651-1751、1652-1752、1653-1753、1654-1754、1655-1755、1656-1756、1657-1757、1658-1758、1659-1759、1660-1760、1661-1761、1662-1762、1663-1763、1664-1764、1665-1765、1666-1766、1667-1767、1668-1768、1669-1769、1670-1770、1671-1771、1672-1772、1673-1773、1674-1774、1675-1775、1676-1776、1677-1777、1678-1778、1679-1779、1680-1780、1681-1781、1682-1782、1683-1783、1684-1784、1685-1785、1686-1786、1687-1787、1688-1788、1689-1789、1690-1790、1691-1791、1692-1792、1693-1793、1694-1794、1695-1795、1696-1796、1697-1797、1698-1798、1699-1799、1700-1800、1701-1801、1702-1802、1703-1803、1704-1804、1705-1805、1706-1806、1707-1807、1708-1808、1709-1809、1710-1810、1711-1811、1712-1812、1713-1813、1714-1814、1715-1815、1716-1816、1717-1817、1718-1818、1719-1819、1720-1820、1721-1821、1722-1822、1723-1823、1724-1824、1725-1825、1726-1826、1727-1827、1728-1828、1729-1829、1730-1830、1731-1831、1732-1832、1733-1833、1734-1834、1735-1835、1736-1836、1737-1837、1738-1838、1739-1839、1740-1840、1741-1841、1742-1842、1743-1843、1744-1844、1745-1845、1746-1846、1747-1847、1748-1848、1749-1849、1750-1850、1751-1851、1752-1852、1753-1853、1754-1854、1755-1855、1756-1856、1757-1857、1758-1858、1759-1859、1760-1860、1761-1861、1762-1862、1763-1863、1764-1864、1765-1865、1766-1866、1767-1867、1768-1868、1769-1869、1770-1870、1771-1871、1772-1872、1773-1873、1774-1874、1775-1875、1776-1876、1777-1877、1778-1878、1779-1879、1780-1880、1781-1881、1782-1882、1783-1883、1784-1884、1785-1885、1786-1886、1787-1887、1788-1888、1789-1889、1790-1890、1791-1891、1792-1892、1793-1893、1794-1894、1795-1895、1796-1896、1797-1897、1798-1898、1799-1899、1800-1900、1801-1901、1802-1902、1803-1903、1804-1904、1805-1905、1806-1906、1807-1907、1808-1908、1809-1909、1810-1910、1811-1911、1812-1912、1813-1913、1814-1914、1815-1915、1816-1916、1817-1917、1818-1918、1819-1919、1820-1920、1821-1921、1822-1922、1823-1923、1824-1924、1825-1925、1826-1926、1827-1927、1828-1928、1829-1929、1830-1930、1831-1931、1832-1932、1833-1933、1834-1934、1835-1935、1836-1936、1837-1937、1838-1938、1839-1939、1840-1940、1841-1941、1842-1942、1843-1943、1844-1944、1845-1945、1846-1946、1847-1947、1848-1948、1849-1949、1850-1950、1851-1951、1852-1952、1853-1953、

1854-1954、1855-1955、1856-1956、1857-1957、1858-1958、1859-1959、1860-1960、1861-1961、1862-1962、1863-1963、1864-1964、1865-1965、1866-1966、1867-1967、1868-1968、1869-1969、1870-1970、1871-1971、1872-1972、1873-1973、1874-1974、1875-1975、1876-1976、1877-1977、1878-1978、1879-1979、1880-1980、1881-1981、1882-1982、1883-1983、1884-1984、1885-1985、1886-1986、1887-1987、1888-1988、1889-1989、1890-1990、1891-1991、1892-1992、1893-1993、1894-1994、1895-1995、1896-1996、1897-1997、1898-1998、1899-1999、1900-2000、1901-2001、1902-2002、1903-2003、1904-2004、1905-2005、1906-2006、1907-2007、1908-2008、1909-2009、1910-2010、1911-2011、1912-2012、1913-2013、1914-2014、1915-2015、1916-2016、1917-2017、1918-2018、1919-2019、1920-2020、1921-2021、1922-2022、1923-2023、1924-2024、1925-2025、1926-2026、1927-2027、1928-2028、1929-2029、1930-2030、1931-2031、1932-2032、1933-2033、1934-2034、1935-2035、1936-2036、1937-2037、1938-2038、1939-2039、1940-2040、1941-2041、1942-2042、1943-2043、1944-2044、1945-2045、1946-2046、1947-2047、1948-2048、1949-2049、1950-2050、1951-2051、1952-2052、1953-2053、1954-2054、1955-2055、1956-2056、1957-2057、1958-2058、1959-2059、1960-2060、1961-2061、1962-2062、1963-2063、1964-2064、1965-2065、1966-2066、1967-2067、1968-2068、1969-2069、1970-2070、1971-2071、1972-2072、1973-2073、1974-2074、1975-2075、1976-2076、1977-2077、1978-2078、1979-2079、1980-2080、1981-2081、1982-2082、1983-2083、1984-2084、1985-2085、1986-2086、1987-2087、1988-2088、1989-2089、1990-2090、1991-2091、1992-2092、1993-2093、1994-2094、1995-2095、1996-2096、1997-2097、1998-2098、1999-2099、2000-2100、2001-2101、2002-2102、2003-2103、2004-2104、2005-2105、2006-2106、2007-2107、2008-2108、2009-2109、2010-2110、2011-2111、2012-2112、2013-2113、2014-2114、2015-2115、2016-2116、2017-2117、2018-2118、2019-2119、2020-2120、2021-2121、2022-2122、2023-2123、2024-2124、2025-2125、2026-2126、2027-2127、2028-2128、2029-2129、2030-2130、2031-2131、2032-2132、2033-2133、2034-2134、2035-2135、2036-2136、2037-2137、2038-2138、2039-2139、2040-2140、2041-2141、2042-2142、2043-2143、2044-2144、2045-2145、2046-2146、2047-2147、2048-2148、2049-2149、2050-2150、2051-2151、2052-2152、2053-2153、2054-2154、2055-2155、2056-2156、2057-2157、2058-2158、2059-2159、2060-2160、2061-2161、2062-2162、2063-2163、2064-2164、2065-2165、2066-2166、2067-2167、2068-2168、2069-2169、2070-2170、2071-2171、2072-2172、2073-2173、2074-2174、2075-2175、2076-2176、2077-2177、2078-2178、2079-2179、2080-2180、2081-2181、2082-2182、2083-2183、2084-2184、2085-2185、2086-2186、2087-2187、2088-2188、2089-2189、2090-2190、2091-2191、2092-2192、2093-2193、2094-2194、2095-2195、2096-2196、2097-2197、2098-2198、2099-2199、2100-2200、2101-2201、2102-2202、2103-2203、2104-2204、2105-2205、2106-2206、2107-2207、2108-2208、2109-2209、2110-2210、2111-2211、2112-2212、2113-2213、2114-2214、2115-2215、2116-2216、2117-2217、2118-2218、2119-2219、2120-2220、2121-2221、2122-2222、2123-2223、2124-2224、2125-2225、2126-2226、2127-2227、2128-2228、2129-2229、2130-2230、2131-2231、2132-2232、2133-2233、2134-2234或2135-2235具有约或至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、

98%或99%同一性的序列。

[0050] 在一些实施方案中,核酸填充序列包含与SEQ ID NO:8或与SEQ ID NO:8互补的序列的碱基1-100、2-101、3-102、4-103、5-104、6-105、7-106、8-107、9-108、10-109、11-110、12-111、13-112、14-113、15-114、16-115、17-116、18-117、19-118、20-119、21-120、22-121、23-122、24-123、25-124、26-125、27-126、28-127、29-128、30-129、31-130、32-131、33-132、34-133、35-134、36-135、37-136、38-137、39-138、40-139、41-140、42-141、43-142、44-143、45-144、46-145、47-146、48-147、49-148、50-149、51-150、52-151、53-152、54-153、55-154、56-155、57-156、58-157、59-158、60-159、61-160、62-161、63-162、64-163、65-164、66-165、67-166、68-167、69-168、70-169、71-170、72-171、73-172、74-173、75-174、76-175、77-176、78-177、79-178、80-179、81-180、82-181、83-182、84-183、85-184、86-185、87-186、88-187、89-188、90-189、91-190、92-191、93-192、94-193、95-194、96-195、97-196、98-197、99-198、100-199、101-200、102-201、103-202、104-203、105-204、106-205、107-206、108-207、109-208、110-209、111-210、112-211、113-212、114-213、115-214、116-215、117-216、118-217、119-218、120-219、121-220、122-221、123-222、124-223、125-224、126-225、127-226、128-227、129-228、130-229、131-230、132-231、133-232、134-233、135-234、136-235、137-236、138-237、139-238、140-239、141-240、142-241、143-242、144-243、145-244、146-245、147-246、148-247、149-248、150-249、151-250、152-251、153-252、154-253、155-254、156-255、157-256、158-257、159-258、160-259、161-260、162-261、163-262、164-263、165-264、166-265、167-266、168-267、169-268、170-269、171-270、172-271、173-272、174-273、175-274、176-275、177-276、178-277、179-278、180-279、181-280、182-281、183-282、184-283、185-284、186-285、187-286、188-287、189-288、190-289、191-290、192-291、193-292、194-293、195-294、196-295、197-296、198-297、199-298、200-299、201-300、202-301、203-302、204-303、205-304、206-305、207-306、208-307、209-308、210-309、211-310、212-311、213-312、214-313、215-314、216-315、217-316、218-317、219-318、220-319、221-320、222-321、223-322、224-323、225-324、226-325、227-326、228-327、229-328、230-329、231-330、232-331、233-332、234-333、235-334、236-335、237-336、238-337、239-338、240-339、241-340、242-341、243-342、244-343、245-344、246-345、247-346、248-347、249-348、250-349、251-350、252-351、253-352、254-353、255-354、256-355、257-356、258-357、259-358、260-359、261-360、262-361、263-362、264-363、265-364、266-365、267-366、268-367、269-368、270-369、271-370、272-371、273-372、274-373、275-374、276-375、277-376、278-377、279-378、280-379、281-380、282-381、283-382、284-383、285-384、286-385、287-386、288-387、289-388、290-389、291-390、292-391、293-392、294-393、295-394、296-395、297-396、298-397、299-398、300-399、301-400、302-401、303-402、304-403、305-404、306-405、307-406、308-407、309-408、310-409、311-410、312-411、313-412、314-413、315-414、316-415、317-416、318-417、319-418、320-419、321-420、322-421、323-422、324-423、325-424、326-425、327-426、328-427、329-428、330-429、331-430、332-431、333-432、334-433、335-434、336-435、337-436、338-437、339-438、340-439、341-440、342-441、343-442、344-443、345-444、346-445、347-446、348-447、349-448、350-449、351-450、352-451、353-452、354-453、355-454、356-455、357-456、358-457、359-458、360-459、361-460、362-461、363-462、364-463、365-464、

366-465、367-466、368-467、369-468、370-469、371-470、372-471、373-472、374-473、375-474、376-475、377-476、378-477、379-478、380-479、381-480、382-481、383-482、384-483、385-484、386-485、387-486、388-487、389-488、390-489、391-490、392-491、393-492、394-493、395-494、396-495、397-496、398-497、399-498、400-499、401-500、402-501、403-502、404-503、405-504、406-505、407-506、408-507、409-508、410-509、411-510、412-511、413-512、414-513、415-514、416-515、417-516、418-517、419-518、420-519、421-520、422-521、423-522、424-523、425-524、426-525、427-526、428-527、429-528、430-529、431-530、432-531、433-532、434-533、435-534、436-535、437-536、438-537、439-538、440-539、441-540、442-541、443-542、444-543、445-544、446-545、447-546、448-547、449-548、450-549、451-550、452-551、453-552、454-553、455-554、456-555、457-556、458-557、459-558、460-559、461-560、462-561、463-562、464-563、465-564、466-565、467-566、468-567、469-568、470-569、471-570、472-571、473-572、474-573、475-574、476-575、477-576、478-577、479-578、480-579、481-580、482-581、483-582、484-583、485-584、486-585、487-586、488-587、489-588、490-589、491-590、492-591、493-592、494-593、495-594、496-595、497-596、498-597、499-598、500-599、501-600、502-601、503-602、504-603、505-604、506-605、507-606、508-607、509-608、510-609、511-610、512-611、513-612、514-613、515-614、516-615、517-616、518-617、519-618、520-619、521-620、522-621、523-622、524-623、525-624、526-625、527-626、528-627、529-628、530-629、531-630、532-631、533-632、534-633、535-634、536-635、537-636、538-637、539-638、540-639、541-640、542-641、543-642、544-643、545-644、546-645、547-646、548-647、549-648、550-649、551-650、552-651、553-652、554-653、555-654、556-655、557-656、558-657、559-658、560-659、561-660、562-661、563-662、564-663、565-664、566-665、567-666、568-667、569-668、570-669、571-670、572-671、573-672、574-673、575-674、576-675、577-676、578-677、579-678、580-679、581-680、582-681、583-682、584-683、585-684、586-685、587-686、588-687、589-688、590-689、591-690、592-691、593-692、594-693、595-694、596-695、597-696、598-697、599-698、600-699、601-700、602-701、603-702、604-703、605-704、606-705、607-706、608-707、609-708、610-709、611-710、612-711、613-712、614-713、615-714、616-715、617-716、618-717、619-718、620-719、621-720、622-721、623-722、624-723、625-724、626-725、627-726、628-727、629-728、630-729、631-730、632-731、633-732、634-733、635-734、636-735、637-736、638-737、639-738、640-739、641-740、642-741、643-742、644-743、645-744、646-745、647-746、648-747、649-748、650-749、651-750、652-751、653-752、654-753、655-754、656-755、657-756、658-757、659-758、660-759、661-760、662-761、663-762、664-763、665-764、666-765、667-766、668-767、669-768、670-769、671-770、672-771、673-772、674-773、675-774、676-775、677-776、678-777、679-778、680-779、681-780、682-781、683-782、684-783、685-784、686-785、687-786、688-787、689-788、690-789、691-790、692-791、693-792、694-793、695-794、696-795、697-796、698-797、699-798、700-799、701-800、702-801、703-802、704-803、705-804、706-805、707-806、708-807、709-808、710-809、711-810、712-811、713-812、714-813、715-814、716-815、717-816、718-817、719-818、720-819、721-820、722-821、723-822、724-823、725-824、726-825、727-826、728-827、729-828、730-829、731-830、732-831、733-832、734-833、735-834、736-

835、737-836、738-837、739-838、740-839、741-840、742-841、743-842、744-843、745-844、746-845、747-846、748-847、749-848、750-849、751-850、752-851、753-852、754-853、755-854、756-855、757-856、758-857、759-858、760-859、761-860、762-861、763-862、764-863、765-864、766-865、767-866、768-867、769-868、770-869、771-870、772-871、773-872、774-873、775-874、776-875、777-876、778-877、779-878、780-879、781-880、782-881、783-882、784-883、785-884、786-885、787-886、788-887、789-888、790-889、791-890、792-891、793-892、794-893、795-894、796-895、797-896、798-897、799-898、800-899、801-900、802-901、803-902、804-903、805-904、806-905、807-906、808-907、809-908、810-909、811-910、812-911、813-912、814-913、815-914、816-915、817-916、818-917、819-918、820-919、821-920、822-921、823-922、824-923、825-924、826-925、827-926、828-927、829-928、830-929、831-930、832-931、833-932、834-933、835-934、836-935、837-936、838-937、839-938、840-939、841-940、842-941、843-942、844-943、845-944、846-945、847-946、848-947、849-948、850-949、851-950、852-951、853-952、854-953、855-954、856-955、857-956、858-957、859-958、860-959、861-960、862-961、863-962、864-963、865-964、866-965、867-966、868-967、869-968、870-969、871-970、872-971、873-972、874-973、875-974、876-975、877-976、878-977、879-978、880-979、881-980、882-981、883-982、884-983、885-984、886-985、887-986、888-987、889-988、890-989、891-990、892-991、893-992、894-993、895-994、896-995、897-996、898-997、899-998、900-999、901-1000、902-1001、903-1002、904-1003、905-1004、906-1005、907-1006、908-1007、909-1008、910-1009、911-1010、912-1011、913-1012、914-1013、915-1014、916-1015、917-1016、918-1017、919-1018、920-1019、921-1020、922-1021、923-1022、924-1023、925-1024、926-1025、927-1026、928-1027、929-1028、930-1029、931-1030、932-1031、933-1032、934-1033、935-1034、936-1035、937-1036、938-1037、939-1038、940-1039、941-1040、942-1041、943-1042、944-1043、945-1044、946-1045、947-1046、948-1047、949-1048、950-1049、951-1050、952-1051、953-1052、954-1053、955-1054、956-1055、957-1056、958-1057、959-1058、960-1059、961-1060、962-1061、963-1062、964-1063、965-1064、966-1065、967-1066、968-1067、969-1068、970-1069、971-1070、972-1071、973-1072、974-1073、975-1074、976-1075、977-1076、978-1077、979-1078、980-1079、981-1080、982-1081、983-1082、984-1083、985-1084、986-1085、987-1086、988-1087、989-1088、990-1089、991-1090、992-1091、993-1092、994-1093、995-1094、996-1095、997-1096、998-1097、999-1098、1000-1099、1000-1100、1001-1101、1002-1102、1003-1103、1004-1104、1005-1105、1006-1106、1007-1107、1008-1108、1009-1109、1010-1110、1011-1111、1012-1112、1013-1113、1014-1114、1015-1115、1016-1116、1017-1117、1018-1118、1019-1119、1020-1120、1021-1121、1022-1122、1023-1123、1024-1124、1025-1125、1026-1126、1027-1127、1028-1128、1029-1129、1030-1130、1031-1131、1032-1132、1033-1133、1034-1134、1035-1135、1036-1136、1037-1137、1038-1138、1039-1139、1040-1140、1041-1141、1042-1142、1043-114、1044-1144、1045-1145、1046-1146、1047-1147、1048-1148、1049-1149、1050-1150、1051-1151、1052-1152、1053-1153、1054-1154、1055-1155、1056-1156、1057-1157、1058-1158、1059-1159、1060-1160、1061-1161、1062-1162、1063-1163、1064-1164、1065-1165、1066-1166、1067-1167、1068-1168、1069-1169、1070-1170、1071-1171、1072-1172、1073-1173、

1074-1174、1075-1175、1076-1176、1077-1177、1078-1178、1079-1179、1080-1180、1081-1181、1082-1182、1083-1183、1084-1184、1085-1185、1086-1186、1087-1187、1088-1188、1089-1189、1090-1190、1091-1191、1092-1192、1093-1193、1094-1194、1095-1195、1096-1196、1097-1197、1098-1198、1099-1199、1100-1200、1101-1201、1102-1202、1103-1203、1104-1204、1105-1205、1106-1206、1107-1207、1108-1208、1109-1209、1110-1210、1111-1211、1112-1212、1113-1213、1114-1214、1115-1215、1116-1216、1117-1217、1118-1218、1119-1219、1120-1220、1121-1221、1122-1222、1123-1223、1124-1224、1125-1225、1126-1226、1127-1227、1128-1228、1129-1229、1130-1230、1131-1231、1132-1232、1133-1233、1134-1234、1135-1235、1136-1236、1137-1237、1138-1238、1139-1239、1140-1240、1141-1241、1142-1242、1143-1243、1144-1244、1145-1245、1146-1246、1147-1247、1148-1248、1149-1249、1150-1250、1151-1251、1152-1252、1153-1253、1154-1254、1155-1255、1156-1256、1157-1257、1158-1258、1159-1259、1160-1260、1161-1261、1162-1262、1163-1263、1164-1264、1165-1265、1166-1266、1167-1267、1168-1268、1169-1269、1170-1270、1171-1271、1172-1272、1173-1273、1174-1274、1175-1275、1176-1276、1177-1277、1178-1278、1179-1279、1180-1280、1181-1281、1182-1282、1183-1283、1184-1284、1185-1285、1186-1286、1187-1287、1188-1288、1189-1289、1190-1290、1191-1291、1192-1292、1193-1293、1194-1294、1195-1295、1196-1296、1197-1297、1198-1298、1199-1299、1200-1300、1201-1301、1202-1302、1203-1303、1204-1304、1205-1305、1206-1306、1207-1307、1208-1308、1209-1309、1210-1310、1211-1311、1212-1312、1213-1313、1214-1314、1215-1315、1216-1316、1217-1317、1218-1318、1219-1319、1220-1320、1221-1321、1222-1322、1223-1323、1224-1324、1225-1325、1226-1326、1227-1327、1228-1328、1229-1329、1230-1330、1231-1331、1232-1332、1233-1333、1234-1334、1235-1335、1236-1336、1237-1337、1238-1338、1239-1339、1240-1340、1241-1341、1242-1342、1243-1343、1244-1344、1245-1345、1246-1346、1247-1347、1248-1348、1249-1349、1250-1350、1251-1351、1252-1352、1253-1353、1254-1354、1255-1355、1256-1356、1257-1357、1258-1358、1259-1359、1260-1360、1261-1361、1262-1362、1263-1363、1264-1364、1265-1365、1266-1366、1267-1367、1268-1368、1269-1369、1270-1370、1271-1371、1272-1372、1273-1373、1274-1374、1275-1375、1276-1376、1277-1377、1278-1378、1279-1379、1280-1380、1281-1381、1282-1382、1283-1383、1284-1384、1285-1385、1286-1386、1287-1387、1288-1388、1289-1389、1290-1390、1291-1391、1292-1392、1293-1393、1294-1394、1295-1395、1296-1396、1297-1397、1298-1398、1299-1399、1300-1400、1301-1401、1302-1402、1303-1403、1304-1404、1305-1405、1306-1406、1307-1407、1308-1408、1309-1409、1310-1410、1311-1411、1312-1412、1313-1413、1314-1414、1315-1415、1316-1416、1317-1417、1318-1418、1319-1419、1320-1420、1321-1421、1322-1422、1323-1423、1324-1424、1325-1425、1326-1426、1327-1427、1328-1428、1329-1429、1330-1430、1331-1431、1332-1432、1333-1433、1334-1434、1335-1435、1336-1436、1337-1437、1338-1438、1339-1439、1340-1440、1341-1441、1342-1442、1343-1443、1344-1444、1345-1445、1346-1446、1347-1447、1348-1448、1349-1449、1350-1450、1351-1451、1352-1452、1353-1453、1354-1454、1355-1455、1356-1456、1357-1457、1358-1458、1359-1459、1360-1460、1361-1461、1362-1462、1363-1463、1364-1464、1365-1465、1366-

1466、1367-1467、1368-1468、1369-1469、1370-1470、1371-1471、1372-1472、1373-1473、1374-1474、1375-1475、1376-1476、1377-1477、1378-1478、1379-1479、1380-1480、1381-1481、1382-1482、1383-1483、1384-1484、1385-1485、1386-1486、1387-1487、1388-1488、1389-1489、1390-1490、1391-1491、1392-1492、1393-1493、1394-1494、1395-1495、1396-1496、1397-1497、1398-1498、1399-1499、1400-1500、1401-1501、1402-1502、1403-1503、1404-1504、1405-1505、1406-1506、1407-1507、1408-1508、1409-1509、1410-1510、1411-1511、1412-1512、1413-1513、1414-1514、1415-1515、1416-1516、1417-1517、1418-1518、1419-1519、1420-1520、1421-1521、1422-1522、1423-1523、1424-1524、1425-1525、1426-1526、1427-1527、1428-1528、1429-1529、1430-1530、1431-1531、1432-1532、1433-1533、1434-1534、1435-1535、1436-1536、1437-1537、1438-1538、1439-1539、1440-1540、1441-1541、1442-1542、1443-1543、1444-1544、1445-1545、1446-1546、1447-1547、1448-1548、1449-1549、1450-1550、1451-1551、1452-1552、1453-1553、1454-1554、1455-1555、1456-1556、1457-1557、1458-1558、1459-1559、1460-1560、1461-1561、1462-1562、1463-1563、1464-1564、1465-1565、1466-1566、1467-1567、1468-1568、1469-1569、1470-1570、1471-1571、1472-1572、1473-1573、1474-1574、1475-1575、1476-1576、1477-1577、1478-1578、1479-1579、1480-1580、1481-1581、1482-1582、1483-1583、1484-1584、1485-1585、1486-1586、1487-1587、1488-1588、1489-1589、1490-1590、1491-1591、1492-1592、1493-1593、1494-1594、1495-1595、1496-1596、1497-1597、1498-1598、1499-1599、1500-1600、1501-1601、1502-1602、1503-1603、1504-1604、1505-1605、1506-1606、1507-1607、1508-1608、1509-1609、1510-1610、1511-1611、1512-1612、1513-1613、1514-1614、1515-1615、1516-1616、1517-1617、1518-1618、1519-1619、1520-1620、1521-1621、1522-1622、1523-1623、1524-1624、1525-1625、1526-1626、1527-1627、1528-1628、1529-1629、1530-1630、1531-1631、1532-1632、1533-1633、1534-1634、1535-1635、1536-1636、1537-1637、1538-1638、1539-1639、1540-1640、1541-1641、1542-1642、1543-1643、1544-1644、1545-1645、1546-1646、1547-1647、1548-1648、1549-1649、1550-1650、1551-1651、1552-1652、1553-1653、1554-1654、1555-1655、1556-1656、1557-1657、1558-1658、1559-1659、1560-1660、1561-1661、1562-1662、1563-1663、1564-1664、1565-1665、1566-1666、1567-1667、1568-1668、1569-1669、1570-1670、1571-1671、1572-1672、1573-1673、1574-1674、1575-1675、1576-1676、1577-1677、1578-1678、1579-1679、1580-1680、1581-1681、1582-1682、1583-1683、1584-1684、1585-1685、1586-1686、1587-1687、1588-1688、1589-1689、1590-1690、1591-1691、1592-1692、1593-1693、1594-1694、1595-1695、1596-1696、1597-1697、1598-1698、1599-1699、1600-1700、1601-1701、1602-1702、1603-1703、1604-1704、1605-1705、1606-1706、1607-1707、1608-1708、1609-1709、1610-1710、1611-1711、1612-1712、1613-1713、1614-1714、1615-1715、1616-1716、1617-1717、1618-1718、1619-1719、1620-1720、1621-1721、1622-1722、1623-1723、1624-1724、1625-1725、1626-1726、1627-1727、1628-1728、1629-1729、1630-1730、1631-1731、1632-1732、1633-1733、1634-1734、1635-1735、1636-1736、1637-1737、1638-1738、1639-1739、1640-1740、1641-1741、1642-1742、1643-1743、1644-1744、1645-1745、1646-1746、1647-1747、1648-1748、1649-1749、1650-1750、1651-1751、1652-1752、1653-1753、1654-1754、1655-1755、1656-1756、1657-1757、1658-1758、

1659-1759、1660-1760、1661-1761、1662-1762、1663-1763、1664-1764、1665-1765、1666-1766、1667-1767、1668-1768、1669-1769、1670-1770、1671-1771、1672-1772、1673-1773、1674-1774、1675-1775、1676-1776、1677-1777、1678-1778、1679-1779、1680-1780、1681-1781、1682-1782、1683-1783、1684-1784、1685-1785、1686-1786、1687-1787、1688-1788、1689-1789、1690-1790、1691-1791、1692-1792、1693-1793、1694-1794、1695-1795、1696-1796、1697-1797、1698-1798、1699-1799、1700-1800、1701-1801、1702-1802、1703-1803、1704-1804、1705-1805、1706-1806、1707-1807、1708-1808、1709-1809、1710-1810、1711-1811、1712-1812、1713-1813、1714-1814、1715-1815、1716-1816、1717-1817、1718-1818、1719-1819、1720-1820、1721-1821、1722-1822、1723-1823、1724-1824、1725-1825、1726-1826、1727-1827、1728-1828、1729-1829、1730-1830、1731-1831、1732-1832、1733-1833、1734-1834、1735-1835、1736-1836、1737-1837、1738-1838、1739-1839、1740-1840、1741-1841、1742-1842、1743-1843、1744-1844、1745-1845、1746-1846、1747-1847、1748-1848、1749-1849、1750-1850、1751-1851、1752-1852、1753-1853、1754-1854、1755-1855、1756-1856、1757-1857、1758-1858、1759-1859、1760-1860、1761-1861、1762-1862、1763-1863、1764-1864、1765-1865、1766-1866、1767-1867、1768-1868、1769-1869、1770-1870、1771-1871、1772-1872、1773-1873、1774-1874、1775-1875、1776-1876、1777-1877、1778-1878、1779-1879、1780-1880、1781-1881、1782-1882、1783-1883、1784-1884、1785-1885、1786-1886、1787-1887、1788-1888、1789-1889、1790-1890、1791-1891、1792-1892、1793-1893、1794-1894、1795-1895、1796-1896、1797-1897、1798-1898、1799-1899、1800-1900、1801-1901、1802-1902、1803-1903、1804-1904、1805-1905、1806-1906、1807-1907、1808-1908、1809-1909、1810-1910、1811-1911、1812-1912、1813-1913、1814-1914、1815-1915、1816-1916、1817-1917、1818-1918、1819-1919、1820-1920、1821-1921、1822-1922、1823-1923、1824-1924、1825-1925、1826-1926、1827-1927、1828-1928、1829-1929、1830-1930、1831-1931、1832-1932、1833-1933、1834-1934、1835-1935、1836-1936、1837-1937、1838-1938、1839-1939、1840-1940、1841-1941、1842-1942、1843-1943、1844-1944、1845-1945、1846-1946、1847-1947、1848-1948、1849-1949、1850-1950、1851-1951、1852-1952、1853-1953、1854-1954、1855-1955、1856-1956、1857-1957、1858-1958、1859-1959、1860-1960、1861-1961、1862-1962、1863-1963、1864-1964、1865-1965、1866-1966、1867-1967、1868-1968、1869-1969、1870-1970、1871-1971、1872-1972、1873-1973、1874-1974、1875-1975、1876-1976、1877-1977、1878-1978、1879-1979、1880-1980、1881-1981、1882-1982、1883-1983、1884-1984、1885-1985、1886-1986、1887-1987、1888-1988、1889-1989、1890-1990、1891-1991、1892-1992、1893-1993、1894-1994、1895-1995、1896-1996、1897-1997、1898-1998、1899-1999、1900-2000、1901-2001、1902-2002、1903-2003、1904-2004、1905-2005、1906-2006、1907-2007、1908-2008、1909-2009、1910-2010、1911-2011、1912-2012、1913-2013、1914-2014、1915-2015、1916-2016、1917-2017、1918-2018、1919-2019、1920-2020、1921-2021、1922-2022、1923-2023、1924-2024、1925-2025、1926-2026、1927-2027、1928-2028、1929-2029、1930-2030、1931-2031、1932-2032、1933-2033、1934-2034、1935-2035、1936-2036、1937-2037、1938-2038、1939-2039、1940-2040、1941-2041、1942-2042、1943-2043、1944-2044、1945-2045、1946-2046、1947-2047、1948-2048、1949-2049、1950-2050、1951-

2051、1952-2052、1953-2053、1954-2054、1955-2055、1956-2056、1957-2057、1958-2058、1959-2059、1960-2060、1961-2061、1962-2062、1963-2063、1964-2064、1965-2065、1966-2066、1967-2067、1968-2068、1969-2069、1970-2070、1971-2071、1972-2072、1973-2073、1974-2074、1975-2075、1976-2076、1977-2077、1978-2078、1979-2079、1980-2080、1981-2081、1982-2082、1983-2083、1984-2084、1985-2085、1986-2086、1987-2087、1988-2088、1989-2089、1990-2090、1991-2091、1992-2092、1993-2093、1994-2094、1995-2095、1996-2096、1997-2097、1998-2098、1999-2099、2000-2100、2001-2101、2002-2102、2003-2103、2004-2104、2005-2105、2006-2106、2007-2107、2008-2108、2009-2109、2010-2110、2011-2111、2012-2112、2013-2113、2014-2114、2015-2115、2016-2116、2017-2117、2018-2118、2019-2119、2020-2120、2021-2121、2022-2122、2023-2123、2024-2124、2025-2125、2026-2126、2027-2127、2028-2128、2029-2129、2030-2130、2031-2131、2032-2132、2033-2133、2034-2134、2035-2135、2036-2136、2037-2137、2038-2138、2039-2139、2040-2140、2041-2141、2042-2142、2043-2143、2044-2144、2045-2145、2046-2146、2047-2147、2048-2148、2049-2149、2050-2150、2051-2151、2052-2152、2053-2153、2054-2154、2055-2155、2056-2156、2057-2157、2058-2158、2059-2159、2060-2160、2061-2161、2062-2162、2063-2163、2064-2164、2065-2165、2066-2166、2067-2167、2068-2168、2069-2169、2070-2170、2071-2171、2072-2172、2073-2173、2074-2174、2075-2175、2076-2176、2077-2177、2078-2178、2079-2179、2080-2180、2081-2181、2082-2182、2083-2183、2084-2184、2085-2185、2086-2186、2087-2187、2088-2188、2089-2189、2090-2190、2091-2191、2092-2192、2093-2193、2094-2194、2095-2195、2096-2196、2097-2197、2098-2198、2099-2199、2100-2200、2101-2201、2102-2202、2103-2203、2104-2204、2105-2205、2106-2206、2107-2207、2108-2208、2109-2209、2110-2210、2111-2211、2112-2212、2113-2213、2114-2214、2115-2215、2116-2216、2117-2217、2118-2218、2119-2219、2120-2220、2121-2221、2122-2222、2123-2223、2124-2224、2125-2225、2126-2226、2127-2227、2128-2228、2129-2229、2130-2230、2131-2231、2132-2232、2133-2233、2134-2234、2135-2235、2136-2236、2137-2237、2138-2238、2139-2239、2140-2240、2141-2241、2142-2242、2143-2243、2144-2244、2145-2245、2146-2246、2147-2247、2148-2248、2149-2249、2150-2250、2151-2251、2152-2252、2153-2253、2154-2254、2155-2255、2156-2256、2157-2257、2158-2258、2159-2259、2160-2260、2161-2261、2162-2262、2163-2263、2164-2264、2165-2265、2166-2266、2167-2267、2168-2268、2169-2269、2170-2270、2171-2271、2172-2272、2173-2273、2174-2274、2175-2275、2176-2276、2177-2277、2178-2278、2179-2279、2180-2280、2181-2281、2182-2282、2183-2283、2184-2284、2185-2285、2186-2286、2187-2287、2188-2288、2189-2289、2190-2290、2191-2291、2192-2292、2193-2293、2194-2294、2195-2295、2196-2296、2197-2297、2198-2298、2199-2299、2200-2300、2201-2301、2202-2302、2203-2303、2204-2304、2205-2305、2206-2306、2207-2307、2208-2308、2209-2309、2210-2310、2211-2311、2212-2312、2213-2313、2214-2314、2215-2315、2216-2316、2217-2317、2218-2318、2219-2319、2220-2320、2221-2321、2222-2322、2223-2323、2224-2324、2225-2325、2226-2326、2227-2327、2228-2328、2229-2329、2230-2330、2231-2331、2232-2332、2233-2333、2234-2334、2235-2335、2236-2336、2237-2337、2238-2338、2239-2339、2240-2340、2241-2341、2242-2342、2243-2343、

2244-2344、2245-2345、2246-2346、2247-2347、2248-2348、2249-2349、2250-2350、2251-2351、2252-2352、2253-2353、2254-2354、2255-2355、2256-2356、2257-2357、2258-2358、2259-2359、2260-2360、2261-2361、2262-2362、2263-2363、2264-2364、2265-2365、2266-2366、2267-2367、2268-2368、2269-2369、2270-2370、2271-2371、2272-2372、2273-2373、2274-2374、2275-2375、2276-2376、2277-2377、2278-2378、2279-2379、2280-2380、2281-2381、2282-2382、2283-2383、2284-2384、2285-2385、2286-2386、2287-2387、2288-2388、2289-2389、2290-2390、2291-2391、2292-2392、2293-2393、2294-2394、2295-2395、2296-2396、2297-2397、2298-2398、2299-2399、2300-2400、2301-2401、2302-2402、2303-2403、2304-2404、2305-2405、2306-2406、2307-2407、2308-2408、2309-2409、2310-2410、2311-2411、2312-2412、2313-2413、2314-2414、2315-2415、2316-2416、2317-2417、2318-2418、2319-2419、2320-2420、2321-2421、2322-2422、2323-2423、2324-2424、2325-2425、2326-2426、2327-2427、2328-2428、2329-2429、2330-2430、2331-2431、2332-2432、2333-2433、2334-2434、2335-2435、2336-2436、2337-2437、2338-2438、2339-2439、2340-2440、2341-2441、2342-2442、2343-2443、2344-2444、2345-2445、2346-2446、2347-2447、2348-2448、2349-2449、2350-2450、2351-2451、2352-2452、2353-2453、2354-2454、2355-2455、2356-2456、2357-2457、2358-2458、2359-2459、2360-2460、2361-2461、2362-2462、2363-2463、2364-2464、2365-2465、2366-2466、2367-2467、2368-2468、2369-2469、2370-2470、2371-2471、2372-2472、2373-2473、2374-2474、2375-2475、2376-2476、2377-2477、2378-2478、2379-2479、2380-2480、2381-2481、2382-2482、2383-2483、2384-2484、2385-2485、2386-2486、2387-2487、2388-2488、2389-2489、2390-2490、2391-2491、2392-2492、2393-2493、2394-2494、2395-2495、2396-2496、2397-2497、2398-2498、2399-2499、2400-2500、2401-2501、2402-2502、2403-2503、2404-2504、2405-2505、2406-2506、2407-2507、2408-2508、2409-2509、2410-2510、2411-2511、2412-2512、2413-2513、2414-2514、2415-2515、2416-2516、2417-2517、2418-2518、2419-2519、2420-2520、2421-2521、2422-2522、2423-2523、2424-2524、2425-2525、2426-2526、2427-2527、2428-2528、2429-2529、2430-2530、2431-2531、2432-2532、2433-2533、2434-2534、2435-2535、2436-2536、2437-2537、2438-2538、2439-2539、2440-2540、2441-2541、2442-2542、2443-2543、2444-2544、2445-2545、2446-2546、2447-2547、2448-2548、2449-2549、2450-2550、2451-2551、2452-2552、2453-2553、2454-2554、2455-2555、2456-2556、2457-2557、2458-2558、2459-2559、2460-2560、2461-2561、2462-2562、2463-2563、2464-2564、2465-2565、2466-2566、2467-2567、2468-2568、2469-2569、2470-2570、2471-2571、2472-2572、2473-2573、2474-2574、2475-2575、2476-2576、2477-2577、2478-2578、2479-2579、2480-2580、2481-2581、2482-2582、2483-2583、2484-2584、2485-2585、2486-2586、2487-2587、2488-2588、2489-2589、2490-2590、2491-2591、2492-2592、2493-2593、2494-2594、2495-2595、2496-2596、2497-2597、2498-2598、2499-2599、2500-2600、2501-2601、2502-2602、2503-2603、2504-2604、2505-2605、2506-2606、2507-2607、2508-2608、2509-2609、2510-2610、2511-2611、2512-2612、2513-2613、2514-2614、2515-2615、2516-2616、2517-2617、2518-2618、2519-2619、2520-2620、2521-2621、2522-2622、2523-2623、2524-2624、2525-2625、2526-2626、2527-2627、2528-2628、2529-2629、2530-2630、2531-2631、2532-2632、2533-2633、2534-2634、2535-2635、2536-

2636、2537-2637、2538-2638、2539-2639、2540-2640、2541-2641、2542-2642、2543-2643、2544-2644、2545-2645、2546-2646、2547-2647、2548-2648、2549-2649、2550-2650、2551-2651、2552-2652、2553-2653、2554-2654、2555-2655、2556-2656、2557-2657、2558-2658、2559-2659、2560-2660、2561-2661、2562-2662、2563-2663、2564-2664、2565-2665、2566-2666、2567-2667、2568-2668、2569-2669、2570-2670、2571-2671、2572-2672、2573-2673、2574-2674、2575-2675、2576-2676、2577-2677、2578-2678、2579-2679、2580-2680、2581-2681、2582-2682、2583-2683、2584-2684、2585-2685、2586-2686、2587-2687、2588-2688、2589-2689、2590-2690、2591-2691、2592-2692、2593-2693、2594-2694、2595-2695、2596-2696、2597-2697、2598-2698、2599-2699、2600-2700、2601-2701、2602-2702、2603-2703、2604-2704、2605-2705、2606-2706、2607-2707、2608-2708、2609-2709、2610-2710、2611-2711、2612-2712、2613-2713、2614-2714、2615-2715、2616-2716、2617-2717、2618-2718、2619-2719、2620-2720、2621-2721、2622-2722、2623-2723、2624-2724、2625-2725、2626-2726、2627-2727、2628-2728、2629-2729、2630-2730、2631-2731、2632-2732、2633-2733、2634-2734、2635-2735、2636-2736、2637-2737、2638-2738、2639-2739、2640-2740、2641-2741、2642-2742、2643-2743、2644-2744、2645-2745、2646-2746、2647-2747、2648-2748、2649-2749、2650-2750、2651-2751、2652-2752、2653-2753、2654-2754、2655-2755、2656-2756、2657-2757、2658-2758、2659-2759、2660-2760、2661-2761、2662-2762、2663-2763、2664-2764、2665-2765、2666-2766、2667-2767、2668-2768、2669-2769、2670-2770、2671-2771、2672-2772、2673-2773、2674-2774、2675-2775、2676-2776、2677-2777、2678-2778、2679-2779、2680-2780、2681-2781、2682-2782、2683-2783、2684-2784、2685-2785、2686-2786、2687-2787、2688-2788、2689-2789、2690-2790、2691-2791、2692-2792、2693-2793、2694-2794、2695-2795、2696-2796、2697-2797、2698-2798、2699-2799、2700-2800、2701-2801、2702-2802、2703-2803、2704-2804、2705-2805、2706-2806、2707-2807、2708-2808、2709-2809、2710-2810、2711-2811、2712-2812、2713-2813、2714-2814、2715-2815、2716-2816、2717-2817、2718-2818、2719-2819、2720-2820、2721-2821、2722-2822、2723-2823、2724-2824、2725-2825、2726-2826、2727-2827、2728-2828、2729-2829、2730-2830、2731-2831、2732-2832、2733-2833、2734-2834、2735-2835、2736-2836、2737-2837、2738-2838、2739-2839、2740-2840、2741-2841、2742-2842、2743-2843、2744-2844、2745-2845、2746-2846、2747-2847、2748-2848、2749-2849、2750-2850、2751-2851、2752-2852、2753-2853、2754-2854、2755-2855、2756-2856、2757-2857、2758-2858、2759-2859、2760-2860、2761-2861、2762-2862、2763-2863、2764-2864、2765-2865、2766-2866、2767-2867、2768-2868、2769-2869、2770-2870、2771-2871、2772-2872、2773-2873、2774-2874、2775-2875、2776-2876、2777-2877、2778-2878、2779-2879、2780-2880、2781-2881、2782-2882、2783-2883、2784-2884、2785-2885、2786-2886、2787-2887、2788-2888、2789-2889、2790-2890、2791-2891、2792-2892、2793-2893、2794-2894、2795-2895、2796-2896、2797-2897、2798-2898、2799-2899、2800-2900、2801-2901、2802-2902、2803-2903、2804-2904、2805-2905、2806-2906、2807-2907、2808-2908、2809-2909、2810-2910、2811-2911、2812-2912、2813-2913、2814-2914、2815-2915、2816-2916、2817-2917、2818-2918、2819-2919、2820-2920、2821-2921、2822-2922、2823-2923、2824-2924、2825-2925、2826-2926、2827-2927、2828-2928、

2829-2929、2830-2930、2831-2931、2832-2932、2833-2933、2834-2934、2835-2935、2836-2936、2837-2937、2838-2938、2839-2939、2840-2940、2841-2941、2842-2942、2843-2943、2844-2944、2845-2945、2846-2946、2847-2947、2848-2948、2849-2949、2850-2950、2851-2951、2852-2952、2853-2953、2854-2954、2855-2955、2856-2956、2857-2957、2858-2958、2859-2959、2860-2960、2861-2961、2862-2962、2863-2963、2864-2964、2865-2965、2866-2966、2867-2967、2868-2968、2869-2969、2870-2970、2871-2971、2872-2972、2873-2973、2874-2974、2875-2975、2876-2976、2877-2977、2878-2978、2879-2979、2880-2980、2881-2981、2882-2982、2883-2983、2884-2984、2885-2985、2886-2986、2887-2987、2888-2988、2889-2989、2890-2990、2891-2991、2892-2992、2893-2993、2894-2994、2895-2995、2896-2996、2897-2997、2898-2998、2899-2999、2900-3000、2901-3001、2902-3002、2903-3003、2904-3004、2905-3005、2906-3006、2907-3007、2908-3008、2909-3009、2910-3010、2911-3011、2912-3012、2913-3013、2914-3014、2915-3015、2916-3016、2917-3017、2918-3018、2919-3019、2920-3020、2921-3021、2922-3022、2923-3023、2924-3024、2925-3025、2926-3026、2927-3027或2928-3028具有约或至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

[0051] 核酸填充序列包含与SEQ ID NO:11或与SEQ ID NO:11互补的序列的碱基1-100、2-101、3-102、4-103、5-104、6-105、7-106、8-107、9-108、10-109、11-110、12-111、13-112、14-113、15-114、16-115、17-116、18-117、19-118、20-119、21-120、22-121、23-122、24-123、25-124、26-125、27-126、28-127、29-128、30-129、31-130、32-131、33-132、34-133、35-134、36-135、37-136、38-137、39-138、40-139、41-140、42-141、43-142、44-143、45-144、46-145、47-146、48-147、49-148、50-149、51-150、52-151、53-152、54-153、55-154、56-155、57-156、58-157、59-158、60-159、61-160、62-161、63-162、64-163、65-164、66-165、67-166、68-167、69-168、70-169、71-170、72-171、73-172、74-173、75-174、76-175、77-176、78-177、79-178、80-179、81-180、82-181、83-182、84-183、85-184、86-185、87-186、88-187、89-188、90-189、91-190、92-191、93-192、94-193、95-194、96-195、97-196、98-197、99-198、100-199、101-200、102-201、103-202、104-203、105-204、106-205、107-206、108-207、109-208、110-209、111-210、112-211、113-212、114-213、115-214、116-215、117-216、118-217、119-218、120-219、121-220、122-221、123-222、124-223、125-224、126-225、127-226、128-227、129-228、130-229、131-230、132-231、133-232、134-233、135-234、136-235、137-236、138-237、139-238、140-239、141-240、142-241、143-242、144-243、145-244、146-245、147-246、148-247、149-248、150-249、151-250、152-251、153-252、154-253、155-254、156-255、157-256、158-257、159-258、160-259、161-260、162-261、163-262、164-263、165-264、166-265、167-266、168-267、169-268、170-269、171-270、172-271、173-272、174-273、175-274、176-275、177-276、178-277、179-278、180-279、181-280、182-281、183-282、184-283、185-284、186-285、187-286、188-287、189-288、190-289、191-290、192-291、193-292、194-293、195-294、196-295、197-296、198-297、199-298、200-299、201-300、202-301、203-302、204-303、205-304、206-305、207-306、208-307、209-308、210-309、211-310、212-311、213-312、214-313、215-314、216-315、217-316、218-317、219-318、220-319、221-320、222-321、223-322、224-323、

225-324、226-325、227-326、228-327、229-328、230-329、231-330、232-331、233-332、234-333、235-334、236-335、237-336、238-337、239-338、240-339、241-340、242-341、243-342、244-343、245-344、246-345、247-346、248-347、249-348、250-349、251-350、252-351、253-352、254-353、255-354、256-355、257-356、258-357、259-358、260-359、261-360、262-361、263-362、264-363、265-364、266-365、267-366、268-367、269-368、270-369、271-370、272-371、273-372、274-373、275-374、276-375、277-376、278-377、279-378、280-379、281-380或282-381具有约或至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

[0052] B.转移质粒

[0053] 在一些实施方案中,本文描述了包含本文所描述的核酸填充序列的腺相关病毒(AAV)质粒。在某些实施方案中,AAV质粒包含编码治疗性肽、调控区或载体骨架或其组合的表达盒。在一些实施方案中,rAAV核酸载体包含单链(ss)或自身互补(sc)的AAV核酸载体,例如单链或自身互补的重组病毒基因组。

[0054] 在一些实施方案中,AAV质粒包含与SEQ ID NO:32具有约或至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一些实施方案中,AAV质粒包含与SEQ ID NO:32相同的序列。在一些实施方案中,AAV质粒EPO包含与SEQ ID NO:33具有约或至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。在一些实施方案中,AAV质粒包含与SEQ ID NO:33相同的序列。

[0055] 在一些实施方案中,AAV质粒不包含polyG/C序列。在一些实施方案中,AAV质粒不包含具有超过2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续鸟嘌呤碱基的序列。在一些实施方案中,AAV质粒不包含在ITR的至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700个或更多个核碱基内具有超过2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续鸟嘌呤碱基的序列。

[0056] 在一些实施方案中,AAV质粒包含本文所描述的表达盒、至少一个ITR和骨架。在一些实施方案中,AAV质粒按顺序包含第一ITR、表达盒、第二ITR和骨架。在一些实施方案中,AAV质粒含有ITR、启动子、剪接供体/剪接受体位点、治疗性肽、polyA序列、ITR、第一填充序列、复制起点、选择标记和第二填充序列。在一些实施方案中,第一填充序列、第二填充序列或第一填充序列和第二填充序列两者不包含CpG岛;第一填充序列、第二填充序列或第一填充序列和第二填充序列两者不包含超过四个相同身份的连续核碱基;第一填充序列、第二填充序列、或第一填充序列和第二填充序列两者包含约40％至约50％的GC含量;第一填充序列、第二填充序列或第一填充序列和第二填充序列两者不编码大于20个氨基酸的可读框(ORF);并且/者或第一填充序列、第二填充序列或第一填充序列和第二填充序列两者不包含限制酶切割位点。

[0057] 表达盒

[0058] 在一些实施方案中,AAV质粒包含位于两个反向末端重复(ITR)序列之间的异源序列。在一些实施方案中,AAV质粒包含表达盒,该表达盒包含位于两个ITR序列之间的异源序列。在一些实施方案中,表达盒位于L-ITR(左ITR)和R-ITR(右ITR)之间。在一些实施方案中,表达盒以5’至3’的顺序包含L-ITR、异源序列和R-ITR。

[0059] 在一些实施方案中,表达盒具有约3000至约6000个核碱基的长度。在一些实施方案中,表达盒具有约4000至约5000个核碱基的长度。在一些实施方案中,表达盒具有约4500至约5000个核碱基的长度。在一些实施方案中,表达盒具有约2000至约3000个核碱基的长度。在一些实施方案中,提供了自身互补的载体,其中该载体包含填充序列,使得该载体的表达盒具有约2000至约3000个核碱基的长度。

[0060] 在一些实施方案中,表达盒包含填充序列。在一些实施方案中,填充序列具有约1000至约10000、约1000至约9000、约1000至约8000、约1000至约7000、约1000至约6000、约1000至约5000、约1000至约4000、约1000至约3000或约1000至约2000个核碱基的长度。在一些实施方案中,填充序列具有约2000至约3000个核碱基的长度。在一些实施方案中,填充序列具有2235个核碱基的长度。在一些实施方案中,填充序列包含与SEQ ID NO:7的至少100个连续碱基对序列具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,填充序列包含与SEQ ID NO:7具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0061] 在一些实施方案中,表达盒包含治疗性肽。在一些实施方案中,表达盒包含至少一个调控区。在一些实施方案中,填充序列位于治疗性肽与调控区之间。在一些实施方案中,该治疗性肽位于填充序列与R-ITR之间。在一些实施方案中,填充序列位于治疗性肽与L-ITR之间。

[0062] a.治疗性肽

[0063] 在一些实施方案中,本文公开的AAV质粒包含编码诊断或治疗蛋白的序列、多肽或分子标志物的生物活性片段、光敏视蛋白、肾上腺素能激动剂、抗凋亡因子、凋亡抑制剂、细胞因子受体、细胞因子、细胞毒素、红细胞生成剂、谷氨酸脱羧酶、糖蛋白、生长因子、生长因子受体、激素、激素受体、干扰素、白细胞介素、白细胞介素受体、激酶、激酶抑制剂、神经生长因子、网蛋白、神经活性肽、神经活性肽受体、神经源性因子、神经源性因子受体、神经毡蛋白、神经营养因子、神经营养蛋白、神经营养蛋白受体、N-甲基-D-天冬氨酸拮抗剂、丛蛋白、蛋白酶、蛋白酶抑制剂、蛋白质脱羧酶、蛋白质激酶、蛋白质激酶抑制剂、蛋白水解蛋白、蛋白水解蛋白抑制剂、脑信号蛋白、脑信号蛋白受体、血清素转运蛋白、血清素摄取抑制剂、血清素受体、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白受体、肿瘤抑制剂或其任何组合。在一些实施方案中,光敏视蛋白包含视紫红质、黑视蛋白、视锥视蛋白、通道视紫红质或细菌相关视蛋白、古细菌相关视蛋白、这些中的任一种的生物活性片段或其组合。

[0064] 在一些实施方案中,本文所描述的AAV质粒包含编码治疗性肽或其生物活性片段的序列,该治疗性肽或其生物活性片段选自GUCY2D、RS1、CNBG3、ADAMTS10、ABCA4或共济蛋白。在一些实施方案中,AAV质粒包含编码以下项的核酸区段:多肽RPE65、斑萎蛋白(BEST1)、REP1、MERTK、SOD2、MYO6A、MFRP、LRAT、KCNJ13、鸟氨酸氨基转移酶(OAT)、CNTF、GDNF、BDNF、IL6、LIF、XIAP、STATS、夜盲蛋白(nyx)、代谢型谷氨酸受体6-mGluR6(Grm6)、瞬时受体电位melastatin 1(Trpm1)、G蛋白偶联受体179(GPR179)和G蛋白、Gp5、βR3、Gα01/2、Gγ13、RGS7、RGS11、REAP、MYO7A、OPN1MW、OPN1LW、CNGA3、CNGB1、Rho、PDE6b、PDE6a、GNAT2、PDE6c、RPGR、RPGR-ORF15、RPGRIP、CLRN1、Ushl c/Harmonin、Mt-ND4、P1-ND4、CYP4V2、其任

何组合或肽片段。在一些实施方案中,本文所描述的AAV质粒包含编码CRISPR-Cas系统的序列。在一些实施方案中,本文所描述的AAV质粒包含编码CRISPR-Cas9系统的序列。

[0065] 在一些实施方案中,编码治疗性肽的序列包含与SEQ ID NO:4的至少100个连续碱基对序列具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该序列编码治疗性肽,该治疗性肽包含约或至少约与SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39、40、41、42、43或44的至少50个连续氨基酸相同的序列。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:4具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.4。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:34具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.34。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:35具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.35。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:36具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,肽包含SEQ ID NO.36。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:37具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.37。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:38具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.38。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:39具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.39。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:40具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.40。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:41具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.41。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:42具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.42。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:43具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.43。在一些实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:44具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO.44。

[0066] b.调控区

[0067] 本公开的任何载体系统可以包括在其中载体待表达的预期宿主细胞中起作用的调控元件。调控元件包括例如启动子、转录终止序列、翻译终止序列、增强子和聚腺苷酸化元件。

[0068] 本公开的任何载体系统可以包括与编码所需多肽的核苷酸序列可操作地连接的启动子序列。考虑用于本公开的启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、人肌球蛋白7a基因衍生的启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、嵌合CMV/鸡β-肌动蛋白启动子(CBA)和CBA的截短形式(smCBA)(参见例如Haire等人2006和美国专利号8,298,818,其各自通过引用并入本文)。另外的光感受器特异性的、人视紫红质激酶(hGRK1)启动子、突触蛋白启动子、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)启动子、视杆特异性IRBP启动子、VMD2(卵黄样黄斑萎缩/Best病)启动子、RPE特异性卵黄样黄斑萎缩-2[VMD2]启动子、EF1-α启动子序列、PGK启动子、Pleiades“PleXXX”启动子、红/绿视锥蛋白启动子PR2.1和PR1.7也被考虑可用于本公开的各个方面的实践中。示例性光感受器细胞特异性启动子包括但不限于hGRK1、IRBP、视杆视蛋白、NRL、GNAT2e-IRBP、L/M视蛋白和视锥抑制蛋白启动子。在一些实施方案中,启动子包含与SEQ ID NO:2具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0069] 在具体实施方案中,启动子是嵌合CMV-β-肌动蛋白启动子。在具体实施方案中,启动子是组织特异性启动子,其在一种或一组组织中显示选择性活性,但在其他组织中活性较低或无活性。在具体实施方案中,启动子是光感受器特异性启动子。在另一个实施方案中,启动子优选为视锥细胞特异性启动子或视杆细胞特异性启动子,或其任何组合。在具体实施方案中,启动子是人MYO7A基因的启动子。在另一个实施方案中,启动子包含视锥转导蛋白α(TαC)基因衍生的启动子。在具体实施方案中,启动子是人GNAT2衍生的启动子。本公开范围内考虑的其他启动子包括但不限于视紫红质启动子(人或小鼠)、cGMP-磷酸二酯酶β-亚基启动子、色素性视网膜炎特异性启动子、RPE细胞特异性启动子[例如卵黄样黄斑萎缩-2(VMD2)启动子(Best1)(Esumi等人,2004)]或其任何组合。

[0070] 可以使用分子生物学和/或病毒学领域的普通技术人员已知的标准技术将启动子掺入载体中。多个拷贝的启动子和/或多个不同的启动子可用于本公开的载体中。在一个这样的实施方案中,启动子可以位于距转录起始位点的距离与在其天然遗传环境中其距转录起始位点的距离大约相同的位置,但该距离的一些变化也是允许的,当然是在启动子活性没有实质性降低的情况下。在本公开的实践中,一个或多个转录起始位点通常包括在所公开的载体内。

[0071] 本公开的载体可进一步包括一个或多个转录终止序列、一个或多个翻译终止序列、一个或多个信号肽序列、一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)和/或一个或多个增强子元件,或其任何组合。转录终止区通常可以从真核或病毒基因序列的3’-非翻译区获得。转录终止序列可以位于编码序列的下游以提供有效的终止。在一些实施方案中,载体包含自切割肽。在一些实施方案中,自切割肽允许超过一种的共表达。在一些实施方案中,自切割肽包含2A自切割肽。在一些实施方案中,肽包含P2A、E2A、F2A或T2A。

[0072] 任何公开的多核苷酸载体还可以进一步包括一个或多个转录后调控序列或一个

或多个聚腺苷酸化信号,包括例如但不限于土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WRPE)、聚腺苷酸化信号序列或内含子/外显子连接/剪接信号或其任何组合。在一些实施方案中,表达盒包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。在一些实施方案中,WPRE包含与SEQ ID NO:5具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,表达盒包含pGH polyA序列。在一些实施方案中,pGH polyA序列包含与SEQ ID NO:6具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,内含子/外显子连接/剪接信号包括SV40SD/SA。在一些实施方案中,SV40SD/SA包含与SEQ ID NO:34具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0073] 信号肽序列是氨基末端肽序列,其编码的信息负责将可操作连接的多肽定位于一个或多个翻译后细胞目的地,包括例如特定细胞器区室,或定位于蛋白质合成和/或活性位点,甚至定位于细胞外环境。

[0074] 增强子-增加基因转录的顺式作用调控元件-也可以包括在所公开的基于AAV的载体系统之一中。各种增强子元件是相关领域的普通技术人员已知的,并且包括但不限于CaMV 35S增强子元件、巨细胞病毒(CMV)早期启动子增强子元件、SV40增强子元件以及其组合和/或衍生物。指导或调节由感兴趣的结构基因编码的mRNA的多腺苷酸化的一种或多种核酸序列也可以任选地包括在本公开的一种或多种载体中。

[0075] 骨架

[0076] 在一些实施方案中,AAV质粒包含骨架。在一些实施方案中,骨架包含ITR外部的质粒区域。在一些实施方案中,填充序列位于表达盒外部。在一些实施方案中,骨架序列为至少约4000、约5000、约6000、约7000、约8000、约9000或约10000个核碱基。在一些实施方案中,骨架序列为约4000至约10000、约4000至约9000、约4000至约8000、约4000至约7000、约40000至约6000或约4000至约5000个核碱基。在一些实施方案中,骨架序列为约5000至约10000、约5000至约9000、约5000至约8000、约5000至约7000或约50000至约6000个核碱基。在一些实施方案中,骨架序列为约1000至约8000、约2000至约8000、约3000至约8000、约4000至约8000、约5000至约8000或约6000至约8000个核碱基。在一些实施方案中,骨架序列足够大以防止反向包装到AAV颗粒中。

[0077] 在一些实施方案中,骨架包含复制起点。在一些实施方案中,核酸填充序列位于复制起点的3'。在一些实施方案中,核酸填充序列位于复制起点与ITR之间。在一些实施方案中,核酸填充序列被定位成使得ITR距离复制起点约2000至约4000个核碱基。在一些实施方案中,核酸填充序列被定位成使得ITR距离复制起点约1000至约4000个核碱基。在一些实施方案中,核酸填充序列被定位成使得ITR距离复制起点约3000至约3500个核碱基。在一些实施方案中,核酸填充序列被定位成使得ITR距离复制起点超过约500、1000、2000、3000、4000或5000个核碱基。在一些实施方案中,核酸填充序列被定位成使得ITR距离复制起点小于约500、1000、2000、3000、4000或5000个核碱基。在一些实施方案中,填充序列被定位成使得ITR距离复制起点约3124个核碱基。

[0078] 在一些实施方案中,骨架序列包含两个填充序列。在一些实施方案中,第一填充序

列位于R-ITR与起点或复制之间。在一些实施方案中,第一填充序列位于R-ITR与抗生素抗性基因之间。在一些实施方案中,第二填充序列位于复制起点与L-ITR之间。在一些实施方案中,第二填充序列位于抗生素抗性基因与L-ITR之间。在一些实施方案中,骨架以5'至3'的顺序包含第一填充序列、复制起点、抗生素抗性基因和第二填充序列。在一些实施方案中,骨架以3'至5'的顺序包含第一填充序列、复制起点、抗生素抗性基因和第二填充序列。

[0079] 在一些实施方案中,第一填充序列具有约1000至约10000、约2000至约9000、约3000至约8000、约4000至约6000个核碱基的长度。在一些实施方案中,第一填充序列具有约3000至约3500个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约3028个核碱基的长度。在一些实施方案中,第一填充序列包含与SEQ ID NO:8的至少100个连续碱基对序列具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,第一填充序列包含与SEQ ID NO:8约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0080] 在一些实施方案中,第二填充序列具有约100至约1000、约100至约900、约100至约800、约100至约700、约100至约600、约100至约500、约100至约400、约100至约300或约100至约200个核碱基的长度。在一些实施方案中,第二填充序列具有约100至约500个核碱基的长度。在一些实施方案中,核酸填充序列具有约381个核碱基的长度。在一些实施方案中,第二填充序列包含与SEQ ID NO:11的至少100个连续碱基对序列具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,第二填充序列包含与SEQ ID NO:11具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0081] 在一些实施方案中,AAV质粒包含选择标记。在一些实施方案中,选择标记是抗生素抗性基因。在一些实施方案中,AAV质粒包含卡那霉素抗性基因。在一些实施方案中,AAV质粒不包含抗生素基因。在一些实施方案中,AAV质粒不包含氨苄青霉素抗生素抗性基因。

[0082] 在一些实施方案中,选择标记是非抗生素选择系统。在一些实施方案中,非抗生素选择系统包含RNA-OUT序列和R6K序列。

[0083] 在一些实施方案中,骨架具有不超过一个复制起点。在一些实施方案中,骨架不具有M13复制起点。

[0084] ITR

[0085] 在一些实施方案中,本文所描述的质粒包含至少一个包含反向重复(ITR)的序列。ITR序列可以衍生自任何AAV血清型(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)或可以衍生自超过一种血清型。在一些实施方案中,ITR序列衍生自AAV2或AAV6。在一些实施方案中,第一血清型的ITR序列衍生自AAV3、AAV2或AAV6。在其他实施方案中,第一血清型的ITR序列衍生自AAV1、AAV5、AAV8、AAV9或AAV10。在一些实施方案中,ITR序列是与衣壳相同的血清型(例如,AAV3ITR序列和AAV3衣壳等)。

[0086] ITR序列和含有ITR序列的质粒是本领域已知的并且是可商购的(参见,例如,可从Vector Biolabs,Philadelphia,Pa.;Cellbiolabs,San Diego,Calif.;Agilent Technologies,Santa Clara,CA;和Addgene,Cambridge,Mass.获得的产品和服务);并且向

骨骼肌的基因递送导致治疗性蛋白质的持续表达和全身递送。在一些实施方案中,核酸载体包含pTR-UF-11质粒骨架,其是含有AAV2ITR的质粒。该质粒可从美国典型培养物保藏中心(ATCC MBA-331)商购获得。

[0087] 在一些实施方案中,ITR序列包含与SEQ ID NO:1具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,ITR序列包含与SEQ ID NO:51具有约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0088] C.三重转染系统

[0089] 在某些方面,本文描述了用于生产AAV质粒的三重质粒转染系统。在一些实施方案中,三重质粒转染系统包含如本文所描述的AAV载体质粒、rep/cap质粒和辅助质粒。

[0090] 在某些方面,本文描述了用于生产AAV质粒的双重质粒转染系统。在一些实施方案中,双重质粒转染系统包含如本文所描述的AAV载体质粒(也称为转移质粒)和辅助质粒,其中辅助质粒包含rep/cap序列。

[0091] 仅为了说明,三重质粒系统或双重质粒转染系统可用于产生相同的AAV质粒。在一种情况下,三重转染系统将包括转染到HEK293T细胞中的pTR-UF11(CBA-GFP)(SEQ ID NO:45)、辅助质粒pALD-X80(SEQ ID NO:47)和rep/cap质粒pACG2(SEQ ID NO:46)。在另一个实施方案中,双重质粒系统将由pTR-UF11(CBA-GFP)(SEQ ID NO:45)和pDG(SEQ ID NO:48)组成。质粒pDG是辅助质粒,其进一步含有驱动AAV2 rep/cap表达的元件。这些三质粒系统和双质粒系统的结果将产生相同的AAV2-GFP产物。

[0092] 辅助质粒

[0093] 在一些实施方案中,本文所描述的系统包含辅助质粒。在一些实施方案中,辅助质粒包含E1a基因、E1b基因、E4基因、E2a、e3基因、E5基因、Fiber基因或VA基因或其组合。在一些实施方案中,辅助质粒包含突变的Fiber基因。在一些实施方案中,Fiber基因包含SEQ ID NO:12的约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。在一些实施方案中,Fiber基因包含SEQ ID NO:13的约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。在一些实施方案中,辅助质粒不包含Fiber基因。

[0094] 在一些实施方案中,辅助质粒包括pDM、pDG、pDP1rs、pDP2rs、pDP3rs、pDP4rs、pDP5rs、pDP6rs、pDG(R484E/R585E)或pDP8.ape质粒。在一些实施方案中,辅助质粒包含SEQ ID NO:47的约或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。在一些实施方案中,辅助质粒包含SEQ ID NO:47。

[0095] Rep/Cap质粒

[0096] 在一些实施方案中,本文所描述的系统包含rep/cap质粒,其包含rep基因(例如,编码Rep78、Rep68、Rep52和Rep40)和cap基因(编码VP1、VP2和VP3,包括如本文所描述的经修饰的VP3区)。在一些实施方案中,将rep/cap质粒转染到生产细胞系中,使得rAAV颗粒可以被包装并随后纯化。在一些实施方案中,rep/cap质粒包含SEQ ID NO:46的约或至少约

80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列。在一些实施方案中,rep/cap质粒包含SEQ ID NO:46。

[0097] 在一些实施方案中,rep基因是衍生自AAV2的rep基因。在一些实施方案中,cap基因衍生自AAV2。在一些实施方案中,rep基因是衍生自AAV12的rep基因。在一些实施方案中,Rep基因是Rep 2-6。在一些实施方案中,Rep基因包含SEQ ID NO:49的约或至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列。在一些实施方案中,Rep基因包含SEQ ID NO:49。

[0098] 在一些实施方案中,cap基因衍生自AAV12。在一些实施方案中,cap基因包括对基因的修饰,以产生本文所描述的经修饰的衣壳蛋白。在一些实施方案中,rep基因包括Rep78、Rep68、Rep52或Rep40。在一些实施方案中,cap基因包含VP1、VP2、VP3或其变体。在一些实施方案中,cap基因包含SEQ ID NO:50的约或至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列。在一些实施方案中,cap基因包含SEQ ID NO:50。

[0099] 在一些实施方案中,本公开提供了衍生自许多不同血清型的改进的rAAV颗粒,该血清型包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV 10、AAV44.9(E531D)及其组合。在一些实施方案中,衣壳蛋白序列阐述于SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31中。在一些实施方案中,衣壳蛋白序列包含SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31。在一些实施方案中,衣壳蛋白序列包含与SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31至少约70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的序列同一性。

[0100] 在一些实施方案中,衣壳包含在如SEQ ID NO:22中所阐述的野生型AAV2衣壳的氨基酸残基处包含非天然氨基酸取代的衣壳。在一些实施方案中,非天然氨基酸取代包括Y272F、Y444F、T491V、Y500F、Y700F、Y704F、Y730F或其组合中的一个或多个。在一些实施方案中,衣壳包含如SEQ ID NO:26中所阐述的野生型AAV6衣壳的氨基酸残基处的非天然氨基酸取代。在一些实施方案中,非天然氨基酸取代包括Y445F、Y705F、Y731F、T492V、S663V或其组合中的一个或多个。

[0101] 在一些实施方案中,衣壳包含AAV2G9,AAV2的变体。

[0102] 在一些实施方案中,衣壳包含如SEQ ID NO:28中所阐述的野生型AAV8衣壳的氨基酸残基533处的非天然氨基酸取代。在一些实施方案中,非天然氨基酸取代是E533K、Y733F或其组合。在一些实施方案中,衣壳包含AAV7BP2,AAV8的变体。

[0103] 在一些实施方案中,衣壳包含如SEQ ID NO:22中所阐述的野生型AAV2衣壳的非天然氨基酸取代。在一些实施方案中,衣壳包含以下中的一种或多种:

[0104] (a)Y444F;

[0105] (b)Y444F+Y500F+Y730F;

[0106] (c)Y272F+Y444F+Y500F+Y730F;

[0107] (d)Y444F+Y500F+Y730F+T491V;或

[0108] (e)Y272F+Y444F+Y500F+Y730F+T491V,或分别如SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30中所阐述的野生型AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7、AAV9或AAV10衣壳蛋白的任一种中与其对应的等同氨基酸位置。

[0109] 在一些实施方案中,衣壳包含如SEQ ID NO:26中所阐述的野生型AAV6衣壳的非天然氨基酸取代。在一些实施方案中,衣壳包含以下中的一种或多种:

[0110] (a)Y445F;

[0111] (b)Y705F+Y731F;

[0112] (c)T492V;

[0113] (d)Y705F+Y731F+T492V;

[0114] (e)S663V;或

[0115] (f)S663V+T492V。

[0116] 在各种实施方案中,rAAV颗粒包含以下衣壳之一,即AAV2的衣壳变体:DGE-DF(也称为'V1V4VR-V')、P2-V2、P2-V3、P2-V1(也称为ME-B)和ME-B(Y-F+T-V)。DGE-DF衣壳变体在野生型AAV2 VP1的氨基酸位置492、493、494、499和500处含有天冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和苯丙氨酸。P2-V2衣壳变体在AAV2 VP1的位置263、490、492、499、500和530处含有丙氨酸、苏氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸和天冬氨酸。P2-V3衣壳变体在AAV2 VP1的位置263、264、444、451、454、455、459、527、530和531处含有天冬酰胺、丙氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、缬氨酸、苏氨酸、精氨酸、天冬氨酸和天冬氨酸。ME-B(Y-F+T-V)衣壳变体在AAV2 VP1(SEQ ID NO:22)的位置492、493、494、499和500处分别含有天冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和苯丙氨酸,在AAV2 VP1的位置546-556处含有SAAGADXAXDS(SEQ ID NO:52)和以下取代:Y272F、Y444F和T491V。

[0117] 在其他实施方案中,rAAV颗粒包含选自AAV6(3pMut)、AAV2(quadYF+T-V)或AAV2(trpYF)的衣壳。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含国际专利公开号WO 2018/156654中描述的任何衣壳变体。

[0118] 在一些实施方案中,AAV颗粒包含包括DGE-DF衣壳、P2-V2衣壳、P2-V3衣壳或ME-B(Y-F+T-V)衣壳在内的衣壳,用于增强所述rAAV颗粒在视网膜细胞中的转导。在一些实施方案中,AAV颗粒包含选自AAV2(Y444F)、AAV2(Y444F+Y500F+Y730F)、AAV2(Y272F+Y444F+Y500F+Y730F)、AAV2(Y444F+Y500F+Y730F+T491V)和AAV2(Y272F+Y444F+Y500F+Y730F+T491V)、AAV6(Y445F)、AAV6(Y705F+Y731F)、AAV6(Y705F+Y731F+T492V)、AAV6(S663V)、AAV6(T492V)或AAV6(S663V+T492V)的衣壳。

[0119] 在一些实施方案中,本公开的rAAV多核苷酸或核酸载体可以包含在具有选自AAV血清型1、AAV血清型2、AAV血清型3、AAV血清型4、AAV血清型5、AAV血清型6、AAV血清型7、AAV血清型8、AAV血清型9或AAV血清型10、AAV449.5(E531D)或病毒领域的普通技术人员已知的任何其他血清型的血清型的病毒体之内。

[0120] 生产

[0121] 在一些实施方案中,本文描述了rAAV颗粒生产的方法。在一些实施方案中,产生或获得一种或多种辅助质粒。在一些实施方案中,产生或获得辅助质粒和rep/cap质粒。在一

些实施方案中,一种或多种辅助质粒包含用于所需AAV血清型的rep和cap ORF以及腺病毒VA、E2A(DBP)和E4基因。在一些实施方案中,所需AAV血清型的rep和cap ORF以及腺病毒VA、E2A(DBP)和E4基因处于其天然启动子的转录控制下。在一些实施方案中,cap ORF包含一个或多个修饰以产生如本文所描述的经修饰的衣壳蛋白。在一些实施方案中,用辅助质粒和含有本文所描述的核酸载体的质粒经由CaPO4-介导的转染、脂质或聚合物分子(诸如聚乙烯亚胺(PEI))转染HEK293细胞(可从ATCC®获得)。在一些实施方案中,将HEK293细胞孵育至少约60小时以允许rAAV颗粒产生。在一些实施方案中,然后将细胞孵育至少60小时以允许rAAV颗粒产生。在一些实施方案中,纯化rAAV颗粒。在一些实施方案中,通过碘克沙醇分步梯度、CsC1梯度、色谱法或聚乙二醇(PEG)沉淀来纯化rAAV颗粒。

[0122] II.方法

[0123] 在一些方面,本公开提供了使用本公开的基因疗法和基于AAV的双载体系统治疗或改善人或动物的疾病或病况(例如眼病)的方法。在具体实施方案中,本公开的方法包括施用本公开的载体系统,该载体系统编码提供疾病或病况的治疗或改善的多肽。在具体实施方案中,本公开的载体以AAV病毒或病毒体提供。载体系统可以在体内或离体施用。

[0124] 在一些实施方案中,本文公开的rAAV载体构建体可以经由玻璃体内注射、视网膜下注射、口服、肠胃外、眼内、静脉内、鼻内、关节内、肌内、皮下、subiLM(载体置于内界膜与视网膜之间)或其组合施用。在一些实施方案中,将本文公开的rAAV载体构建体单次施用于对象。在一些实施方案中,rAAV载体构建体在一个或多个施用期内施用于对象,例如每天至少一次、每天两次、每天三次、每周一次、每周两次、每月一次、每月两次或每年至少一次。在一些实施方案中,基于AAV载体的治疗剂可以在每天、每周、每月或更低频率的一个或多个时间段中连续提供,这可能是实现治疗或改善所治疗的疾病或病症的一种或多种症状所必需的。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物可以单次或多次施用,例如每天、每周、每两周或每月、每小时,或者在所治疗的疾病、病症或病况再发、复发或进展时施用。

[0125] 在一些实施方案中,通过注射到椭圆囊中,将载体系统施用于例如耳朵的毛细胞,椭圆囊是对重力敏感的两个囊状耳石器官之一,如Lee等人,Hearing Research Vol.394(2020)107882中所述,其通过引用并入本文。可以通过圆窗注射或在耳蜗植入手术期间施用至例如耳朵的毛细胞。在具体实施方案中,本公开的载体系统通过眼内、玻璃体内或视网膜下注射施用于人或动物。

[0126] 在一些实施方案中,将任何公开的载体、病毒体或组合物施用于有需要的对象提供视网膜色素上皮(RPE)细胞中黑素体迁移的部分或完全恢复。在示例性实施方案中,施用任何多核苷酸载体系统、病毒体或组合物提供视力丧失的部分或完全恢复。

[0127] 在一些实施方案中,本文描述了使用所描述的rAAV颗粒或本文所描述的载体、病毒体、表达系统、组合物和宿主细胞制备用于诊断、预防、治疗或改善动物特别是眼中的疾病、功能障碍、病症、异常状况、缺陷、损伤或创伤的至少一种或多种症状的药物的方法。在一些实施方案中,该方法包括向有需要的哺乳动物的一只或两只眼睛的玻璃体直接施用一种或多种所描述的载体、病毒体、病毒颗粒、宿主细胞、组合物或其多种,其量和时间足以诊断、预防、治疗或减轻受影响的动物的一只或两只眼睛中的此类疾病、功能障碍、病症、异常状况、缺陷、损伤或创伤的一种或多种症状。

[0128] 在一些方面,本公开提供了本文所描述的颗粒、载体、病毒体、表达系统、组合物和

宿主细胞在治疗或改善哺乳动物眼睛中各种缺陷症状(特别是人类光感受器或RPE细胞中的一种或多种缺陷)的方法中的使用方法,或在制备用于治疗或改善该症状的药物中的使用方法。在一些实施方案中,用于治疗或改善症状的眼部疾病和病症(例如,由PR或RPE细胞中的一种或多种遗传缺陷引起)包括色素性视网膜炎、Leber先天性黑蒙(例如,LCA10)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD、葡萄膜炎、Best病、Stargardt病、Usher综合征、地图样萎缩、糖尿病性视网膜病、视网膜劈裂、全色盲、无脉络膜症、Bardet Biedl综合征、常染色体显性视锥-视杆营养不良(CORD6)、青光眼(包括原发性开角型青光眼)、弗里德赖希共济失调、糖原贮积病(眼部表现)、先天性静止性夜盲、Leber遗传性视神经病变(LHON)、或bietti结晶性营养不良。在一些实施方案中,该方法包括向有需要的对象的一只或两只眼睛玻璃体内或视网膜下施用一种或多种所描述的颗粒载体、病毒体、宿主细胞或组合物,其量和时间足以治疗或改善受影响的哺乳动物中此类缺陷的症状。在一些实施方案中,该方法包括预防性治疗疑似患有此类病况的动物,或在诊断之后或在症状发作之前向处于发展此类病况的风险中的那些动物施用此类组合物。在一些实施方案中,rAAV颗粒不包含在嵌合病毒/非病毒纳米颗粒中。

[0129] III.药物组合物

[0130] 适于注射或输注的药物剂型可以包括无菌水溶液或分散体或包含活性成分的无菌粉末,其适于临时制备无菌可注射或可输注溶液或分散体,任选地包封在脂质体中。最终的剂型应该是无菌的、流体的并且在制造和储存条件下是稳定的。液体载剂或媒介物可以是溶剂或液体分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、植物油、无毒甘油酯及其合适的混合物。适当的流动性可以例如通过形成脂质体、在分散体的情况下通过维持所需的粒度或通过使用表面活性剂来维持。任选地,可以通过各种其他抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖、缓冲剂或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0131] 本公开还提供了药物组合物,其包含与药学上可接受的载剂组合的本公开的载体系统。包含一定量的化合物的适于局部或肠胃外施用的药物组合物构成本公开的优选实施方案。在本公开的上下文中,向患者(特别是人)施用的剂量应足以在合理的时间范围内在患者中实现治疗反应,而没有致死毒性,并且优选地引起不超过可接受水平的副作用或发病率。本领域技术人员将认识到,剂量将取决于多种因素,包括对象的状况(健康)、对象的体重、并行治疗的种类(如果有的话)、治疗频率、治疗比以及病理状况的严重程度和阶段。

[0132] 本公开还提供了在一个或多个容器中包含本公开的载体系统的试剂盒。本公开的试剂盒可任选地包括药学上可接受的载剂和/或稀释剂。在具体实施方案中,本公开的试剂盒包括如本文所描述的一种或多种其他组分、助剂或佐剂。在具体实施方案中,本公开的试剂盒包括说明书或包装材料,其描述如何将包含在试剂盒内的载体系统施用于选定的哺乳动物接受者。

[0133] 所公开的试剂盒的容器可以是任何合适的材料,例如玻璃、塑料、金属等,并且可以是任何合适的尺寸、形状或构造。在具体实施方案中,本公开的载体系统作为固体提供在试剂盒中。在另一个实施方案中,本公开的载体系统作为液体或溶液提供在试剂盒中。在一些实施方案中,试剂盒可以包括一个或多个安瓿或注射器,其含有呈合适的液体或溶液形

式的本公开的载体系统。

[0134] 本文进一步考虑了含有任何公开的双载体(前半载体和后半载体)的预混合物的试剂盒。这些预混合物可以以合适的液体或溶液形式存在于单个容器和/或单一药物产品中。

[0135] 本公开还提供了本文公开的缓冲剂和组合物在制备用于治疗、预防或改善疾病、病症、功能障碍、损伤或创伤的症状的药物中的用途,包括但不限于疾病、病症或功能障碍的治疗、预防和/或预防法,和/或改善此类疾病、病症或功能障碍的一种或多种症状。

[0136] AAV组合物的量和此类组合物的施用时间将在受益于本教导的技术人员的能力范围内。治疗有效量的所公开的组合物的施用可以通过单次施用来实现,例如单次注射足够数量的感染性颗粒以向经历此类治疗的患者提供治疗益处。或者,在一些情况下,可能需要在相对短的时间内或在相对长的时间内提供AAV载体组合物的多次或连续施用,这可以由监督此类组合物施用的执业医师确定。

[0137] 例如,施用于哺乳动物的感染性颗粒的数量可以是大约10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}或甚至更多个感染性颗粒/mL,作为单剂量(或分成两次或多次施用等)给予,这可能是实现所治疗的特定疾病或病症的治疗所需要的。事实上,在一些实施方案中,可能需要单独或与一种或多种其他诊断剂、药物、生物活性剂等组合施用两种或更多种不同的基于rAAV颗粒或载体的组合物,以实现特定方案或疗法的所需效果。

[0138] 为了表达根据本发明的治疗剂,可以制备rAAV颗粒,其包含在一个或多个启动子控制下的治疗剂编码核酸区段。为了使序列处于启动子的“控制”之下,通常将转录阅读框的转录起始位点的5’末端定位在所选启动子的“下游”(例如3’)约1至约50个核苷酸之间。“上游”启动子刺激DNA的转录并促进编码的多肽的表达。这是本文中“重组表达”的含义。在一些实施方案中,重组载体构建体是包括衣壳蛋白修饰的rAAV载体的那些,该rAAV载体含有与编码一种或多种诊断剂和/或治疗剂的至少一个核酸区段可操作地连接的RPE细胞特异性启动子或感光细胞特异性启动子。

[0139] 当考虑使用这样的载体将一种或多种外源蛋白、多肽、肽、核酶和/或反义寡核苷酸引入用载体转染的特定细胞时,可以使用本文公开的rAAV颗粒将一种或多种外源多核苷酸递送至选定的宿主细胞,例如递送至哺乳动物眼睛内的一种或多种选定的细胞。在一些实施方案中,细胞是视网膜神经节细胞、muller神经胶质细胞、双极细胞、星形胶质细胞、无长突细胞、小梁网细胞、感光细胞或视网膜色素上皮细胞。在一些实施方案中,细胞是感光细胞。在一些实施方案中,细胞是视网膜色素上皮(RPE)细胞。

[0140] 在一些实施方案中,施用于对象的病毒颗粒的数量可以是10^6-10^{14}个颗粒/mL或10^3-10^{15}个颗粒/mL的数量级。在一个实施方案中,可以施用高于10^{13}个颗粒/mL的病毒颗粒。在一些实施方案中,施用于对象的病毒颗粒的数量可以是约10^6至10^{14}个载体基因组(vg)/mL或10^3至10^{15}个vg/mL。在一个实施方案中,施用高于10^{13}个vg/mL的病毒颗粒。病毒颗粒可以作为单剂量施用,或者根据需要分成两次或更多次施用,以实现所治疗的特定疾病或病症的治疗。

[0141] 在一些实施方案中,本公开提供了本文公开的一种或多种基于病毒的组合物在药学上可接受的溶液中的制剂,用于单独或与一种或多种其他治疗方式组合施用于细胞或动物,特别是用于治疗人细胞、组织和影响人的疾病。

[0142] 如果需要,本文所描述的rAAV颗粒也可以与其他药剂例如蛋白质或多肽或各种药物活性药剂组合施用包括治疗性多肽、其生物活性片段或变体的一次或多次全身或局部施用。事实上,对也可以包括的其他组分实际上没有限制,只要该另外的试剂在与靶细胞或宿主组织接触时不会引起显著的副作用。因此,rAAV颗粒可以与特定情况下所需的各种其他药剂一起递送。这样的组合物可以从宿主细胞或其他生物来源纯化,或者可以如本文所描述化学合成。

[0143] 药学上可接受的缓冲液、赋形剂和载剂溶液的配制是本领域技术人员公知的,如开发合适的给药和治疗方案,用于在各种治疗方案中使用本文所描述的特定组合物,包括例如口服、肠胃外、眼内(例如视网膜下或玻璃体内)、静脉内、鼻内、关节内、椭圆囊内、耳蜗内和肌内施用和配制。

[0144] 通常,这些制剂可以含有至少约0.1%或更多的治疗剂(例如rAAV颗粒),但活性成分的百分比当然可以变化,并且可以方便地为总制剂重量或体积的约1或2%至约70%或80%或更多。自然地,每种治疗上有用的组合物中的治疗剂的量可以以这样的方式制备,使得在化合物的任何给定单位剂量中获得合适的剂量。制备此类药物制剂的领域的技术人员将考虑诸如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品保质期以及其他药理学考虑的因素,因此,可能需要多种剂量和治疗方案。

[0145] 术语"赋形剂"指与rAAV颗粒一起施用的稀释剂、佐剂、载剂或媒介物。此类药物赋形剂可以是无菌液体,例如水和油,包括石油(如矿物油)、植物油(如花生油、大豆油和芝麻油)、动物油或合成来源的油。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载剂。示例性赋形剂和媒介物包括但不限于HA、BSS、人工CSF、PBS、乳酸林格氏液、TMN200溶液、聚山梨醇酯20和泊洛沙姆100。

[0146] rAAV颗粒组合物的量和此类组合物的施用时间将在受益于本教导的技术人员的范围内。然而,可能的是,治疗有效量的所公开的组合物的施用可通过单次施用来实现,例如单次注射足够数量的病毒颗粒以向经历此类治疗的患者提供治疗益处。或者,在一些情况下,可能希望在相对较短或相对较长的时间段内提供组合物的多次或连续施用,这可由执业医师监督此类组合物的施用来确定。

[0147] 示例性的组合物可以包括单独的rAAV颗粒或核酸载体,或与一种或多种另外的活性成分组合的rAAV颗粒或核酸载体,该活性成分可以从天然或重组来源获得或化学合成。

[0148] IV.定义

[0149] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、符号和其他技术和科学术语或术语旨在具有与所要求保护的主题所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考,本文定义了具有通常理解的含义的术语,并且本文包括的这些定义不应被解释为表示与本领域通常理解的实质差异。

[0150] 在整个本申请中,各种实施方案可以以范围格式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,而不应当被解释为对本公开的范围的硬性限制。因此,范围的描述应被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,诸如1至6的范围的描述应被认为具有具体公开的子范围,诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数字,例如1、2、3、4、5和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0151] 如说明书和权利要求书中所使用的,单数形式"一个"、"一种"和"该"包括复数引

用,除非上下文另有明确说明。例如,术语“样品”包括多个样品,包括其混合物。

[0152] 术语“确定”、“测量”、“评价”、“评估”、“测定”和“分析”在本文中通常可互换使用,以指测量的形式。这些术语包括确定元素是否存在(例如,检测)。这些术语可以包括定量、定性或定量和定性测定。评估可以是相对的或绝对的。“检测……的存在”可以包括确定存在的某物的量,以及根据上下文确定它是存在还是不存在。

[0153] 术语“对象”、“个体”或“患者”在本文中通常可互换使用。“对象”可以是含有表达的遗传物质的生物实体。生物实体可以是植物、动物或微生物,包括例如细菌、病毒、真菌和原生动物。对象可以是体内获得或体外培养的生物实体的组织、细胞及其后代。对象可以是哺乳动物。哺乳动物可以是人。对象可以被诊断或怀疑处于疾病的高风险。在一些情况下,对象不一定被诊断或怀疑处于疾病的高风险。

[0154] 术语“体内”用于描述在对象体内发生的事件。

[0155] 术语“离体”用于描述发生在对象体外的事件。不对对象进行离体测定。相反,它在从对象分离的样品上进行。对样品进行的离体测定的实例是“体外”测定。

[0156] 术语“体外”用于描述包含在用于容纳实验室试剂的容器中发生的事件,使得其与获得该材料的生物来源分离。体外测定可以包括基于细胞的测定,其中使用活细胞或死细胞。体外测定还可以包括无细胞测定,其中不使用完整细胞。

[0157] 如本文所用,术语“约”数字是指该数字加或减该数字的10%。术语“约”范围是指该范围减去其最低值的10%并加上其最大值的10%。

[0158] 如本文所用,术语“治疗”用于指用于在接受者中获得有益或期望结果的药物或其他干预方案。有益或期望的结果包括但不限于治疗益处和/或预防性益处。治疗益处可以指根除或改善所治疗的症状或潜在病症。此外,治疗益处可以通过根除或改善与潜在病症相关的一种或多种生理症状来实现,使得在对象中观察到改善,尽管对象可能仍然患有潜在病症。预防性效果包括延迟、预防或消除疾病或病况的出现,延迟或消除疾病或病况的症状的发作,减缓、停止或逆转疾病或病况的进展,或其任何组合。对于预防性益处,具有发展特定疾病风险的对象或报告疾病的一种或多种生理症状的对象可以经历治疗,即使可能尚未对该疾病进行诊断。

[0159] 如本文所用,术语“启动子”是指调节转录的核酸序列的一个或多个区域。

[0160] 如本文所用,术语“调控元件”是指调节转录的核酸序列的一个或多个区域。示例性调控元件包括但不限于增强子、转录后元件、转录控制序列等。

[0161] 如本文所用,术语“载体”是指能够在宿主细胞中复制的核酸分子(通常由DNA组成),和/或另一个核酸区段可以可操作地连接到该核酸分子,以便引起所连接区段的复制。质粒、粘粒或病毒是示例性载体。在一些实施方案中,载体是AAV质粒。

[0162] 如本文所用,在两个核酸分子、核苷酸序列或蛋白质序列的上下文中,短语“基本上相同”或“基本相同”,指当比较和比对以获得最大对应性时,两个或更多个序列或子序列具有至少约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%核苷酸或氨基酸残基同一性,如使用以下序列比较算法之一或通过目测所测量的。在一些实施方案中,基本相同是指两个或更多

个序列或子序列具有至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、96％、97％、98％或99％同一性。对于序列比较,通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0163] 对用于比对比较窗口的序列的最佳比对是通过工具,例如Smith和Waterman的局部同源性算法、Needleman和Wunsch的同源性比对算法、Pearson和Lipman的相似性搜索方法,并且任选地通过这些算法的计算机化实现方式来进行,该计算机化实现是例如GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,可作为GCG®Wisconsin Package®(Accelrys Inc.,San Diego,CA)的一部分获得。测试序列和参考序列的比对区段的“同一性分数”是两个比对序列共有的相同组分的数量除以参考序列区段(即整个参考序列或参考序列的较小限定部分)中组分的总数。序列同一性百分比表示为同一性分数乘以100。一个或多个多核苷酸序列的比较是针对全长多核苷酸序列或其部分,或针对更长的多核苷酸序列。在一些情况下,使用BLASTX 2.0版(对于翻译的核苷酸序列)和BLASTN 2.0版(对于多核苷酸序列)确定“同一性百分比”。

[0164] 相对于参考多肽序列的序列同一性百分比(％)是在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大序列同一性百分比之后并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分的情况下,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以已知的各种方式实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。能够确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的算法。在一些实施方案中,可以使用序列比较程序ALIGN 2生成氨基酸序列同一性％值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech,Inc.编写,并且源代码已经与用户文档一起提交到美国版权局(Washington D.C.,20559),其以美国版权注册号TXU510087进行了注册。ALIGN-2程序可从Genentech,Inc.,South San Francisco,Calif.公开获得,或者可以从源代码编译ALIGN-2程序应编译用于UNIX操作系统,包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定并且不变。

[0165] 在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与、同或相对于给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性％(其可以替代地表述为给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B具有或包含的相同的特定％氨基酸序列)计算如下:100乘以分数X/Y,其中X是序列比对程序ALIGN-2对A和B进行比对时得到的相同匹配的氨基酸残基数量,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的氨基酸序列同一性％将不等于B与A的氨基酸序列同一性％。除非另有特别说明,本文所用的所有氨基酸序列同一性％值是使用ALIGN-2计算机程序如前一段所描述来获得的。

[0166] 本文中使用的章节标题仅用于组织目的,并且不应被解释为限制所描述的主题。

[0167] V.实施例

[0168] 以下实施例仅被包含用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

[0169] 实施例1:氨苄青霉素和抗生素抗性细胞中ITR的损失

[0170] ITR质粒的产生易受复制错误的影响。ITR在卡那霉素抗性相容细胞系中高度不稳

定。在卡那霉素抗性Endura细胞和氨苄青霉素抗性SURE细胞中扩增含有ITR的AAV质粒。纯化的质粒用SmaI线性化,得到2000至3000个碱基对之间的两个条带和500至700个碱基对之间的三个条带,如图1A的泳道1所示。质粒内ITR的损失导致5000bp处的条带。在氨苄青霉素抗性细胞(图1B)中扩增的质粒显示出比在卡那霉素抗性细胞(图1C)中扩增的质粒更低的ITR,如5000bp处的条带所示。

[0171] 从卡那霉素抗性质粒除去图2A(箭头)中描绘的polyG/C序列。另外,去除与R-ITR相邻的polyC。将质粒用SmaI消化并在凝胶上跑胶以鉴定ITR的稳定性。如图2B所示,通过去除polyG/C序列改善了ITR稳定性(比较图2B与图1B)。

[0172] 实施例2:用填充序列防止反向包装

[0173] 包装rAAV盒的效率因空衣壳和反向包装的骨架序列的产生而降低,如图3所示。设计填充序列以增加骨架的大小以减少反向包装。首先随机产生填充DNA序列。接下来,使大于20个氨基酸的所有可读框突变。接下来,使CpG岛突变直至不可再检测到CpG岛。接下来,去除大多数限制酶位点。接下来,去除大于4个核碱基的重复串。

[0174] 如图4A所示,将填充序列插入位于起点5'的位点的骨架中。将质粒分离并用SmaI消化以鉴定对ITR稳定性的影响。如图4B所示,观察到较大的ITR损失。

[0175] 如图5A所示设计第二质粒。填充物位于复制起点的3'。将抗性基因修饰为标准化KanR。除去M13复制起点。将质粒分离并用SmaI消化以确定ITR稳定性。如图5B所示,观察到很少到没有ITR损失。

[0176] 将polyG/C序列重新引入图5B所示的质粒中。将质粒在卡那霉素抗性细胞中扩增,分离,并用SmaI消化。如图6所示,观察到ITR损失。这表明填充物放置和polyG/C去除都是增强ITR稳定性所必需的。

[0177] 实施例3:修饰的转移质粒骨架的稳定性。

[0178] 在SURE细胞中扩增原始转移质粒。最终的转移质粒(图5A)在Endura细胞中扩增。产生并分离10mg DNA。用SmaI或AdhI消化质粒。原始SmaI质粒显示出比修饰的质粒更大的损失,如图7所示。

[0179] 实施例4:三质粒系统用于表达人视网膜劈裂蛋白的用途

[0180] 转移质粒

[0181] 该质粒产生设计用于在视网膜中表达人视网膜劈裂蛋白(hRS1)的单链rAAV基因组。制备含有四个同义取代的从头合成的RS1cDNA以促进限制酶分子克隆。人RS1的表达在视杆和视锥光感受器中由hGRK1启动子特异性驱动,该hGRK1启动子与SV40剪接供体/剪接受体偶联,该SV40剪接供体/剪接受体在去除SV40内含子后促进mRNA转运至细胞质。通过紧接在hRS1syn起始密码子之前掺入共有Kozak序列来增强翻译,并且通过紧接在hRS1 syn可读框之后包含WPRE来增强转录物的稳定性。所使用的WPRE版本含有设计用于消除推定的X蛋白ORF14,15的表达。表达盒以牛生长激素聚腺苷酸化信号(bGH poly A)结束。

[0182] 质粒的初始构建开始于将先前描述的人RS1syn克隆到先前使用的含有AAV2 ITR、hGRK1启动子、SV40 SD/SA和bGH polyA的AAV载体质粒中。随后将WPRE克隆到从pJET-WPRE的位置以产生pTR-X002(pTR-GRK1-RS1syn-WPRE)。由于可能存在异常包装,小尺寸的载体(2,311bp)是不期望的;因此,将惰性填充序列添加到bGH polyA的3'以产生4,549bp载体盒,接近野生型AAV基因组的最佳包装大小。2,234bp填充序列使用随机DNA发生器

(molbiotools.com)通过计算机模拟设计,并经策划以去除正义/反义链上大于20个氨基酸的所有可读框(ORF),耗尽CpG岛并去除大于4个核苷酸的重复序列。使用SacI/SphI限制酶克隆从头合成并克隆该序列,以将填充序列置于bGH polyA的3'末端以产生pTR-X002-3p(图8B)。然后将该盒包装到AAV.SPR中,并经确定与RS1KO小鼠模型中的原始未填充盒相比具有改善的功效。为了产生质粒的最终版本(pTR-X002-3pSR),卡那霉素抗性骨架(衍生自pUC57-KanR)从头合成为含有另外的填充序列(不同于内部rAAV盒填充物),并使用两个PacI限制性位点克隆入。设计该大骨架(5,808bp ITR-ITR)以通过超过rAAV包装能力来防止反向包装。在马萨诸塞州总医院测序中心(Boston,MA)通过全质粒下一代测序对整个质粒进行序列验证。pTR-X002-3pSR质粒的注释图谱显示在(图8A)中,并且展示克隆策略的图显示在图8B中。

[0183] 载体填充序列

[0184] 2,234bp的填充序列在Atsena Therapeutics使用随机DNA发生器(molbiotools.com)通过计算机模拟设计,并进行策划以去除正义/反义链上大于20个氨基酸的所有可读框(ORF),耗尽CpG岛并去除大于4个核苷酸的重复序列。该填充序列和骨架填充序列是不同的,衍生自随机DNA发生器的不同运行。

[0185] AAV-SPR Rep/Cap质粒:pC44.9(E531D)-R

[0186] 构建祖细胞AAV2 rep-AAV.SPR质粒pCAAV.SPR。pCAAV.SPR由pACG2构建,其中AAV2VP1编码序列被AAV.SPR编码序列替代。rep和cap基因两者都处于内源AAV启动子元件的控制之下。编码VP1/VP2/VP3的AAV.SPR cap序列通过从头合成(Genscript NJ)产生。

[0187] 原始pCAAV.SPR骨架含有氨苄青霉素选择标记(AmpR)和与pACG2构建相关的不需要的遗留序列。使用限制酶克隆和不依赖于连接的克隆方法修饰质粒以去除不需要的序列,并用来自pUC57-KanR(Genscript,NJ)的卡那霉素抗性(KanR)基因和复制起点替换复制起点和AmpR。该最终的pCAAV.SPR-R质粒(图8C)已经通过马萨诸塞州总医院测序中心的下一代测序完全验证,并证实在小规模模型中正确包装。pCAAV.SPR-R质粒的注释图谱显示在图8C中。

[0188] 辅助质粒:pALD-X80

[0189] 辅助质粒DNA向细胞提供来自5型腺病毒的E2a、E4和VA RNA辅助基因,以支持载体生产,而不需要野生型病毒共感染。pALD-X80质粒的注释图谱显示在图8D中。

[0190] 实施例5:具有填充序列的含hRS1的rAAV载体的评价

[0191] 进行本研究以评价基因组大小有利于有效包装的优化的含hRS1的AAV.SPR载体。目标是鉴定至少与rAAV.SPR-X001一样有效的构建体。

[0192] 由于pTR-X001的小包装尺寸(1723bp)和异源基因组包装的可能性,设计了几种新的构建体,其盒尺寸接近AAV的天然携带能力(约4.7Kb ITR至ITR盒)。这是通过添加插入载体盒内的惰性填充序列来完成的,该惰性填充序列插入至hGRK1-hRS1syn-bGH polyA的5'至(X001-5p)或3'至(X001-3p)(分别为pTR-X001-5p和pTR-X001-3p)。填充DNA是从头合成的(Genscript,NJ)。另外,创建了一种形式,其掺入位于hRS1syn与bGH polyA(pTR-X002-3p)之间的土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。所使用的WPRE的突变体形式先前已被并入用于其他眼部基因治疗临床试验的AAV载体中。所有构建体都含有相同的hGRK1启动子、SV40SD/SA和bGH polyA信号序列。通过包装这些表达盒产生rAAV.SPR载体,并且载体基

因组的大小范围为4534-4549个核苷酸。评估的多个构建体在图9A-9C中表示。

[0193] 使用两种载体剂量进行3个月的非临床研究,以测试RS1KO小鼠中视网膜结构/功能的恢复。包括“未填充的”载体pTR-X001(rAAV.SPR-X001)作为比较对照,其在先前描述的RS 1KO小鼠研究中挽救视网膜结构/功能。

[0194] 盒选择研究设计的总结见表1。向RS1KO小鼠的一只眼睛中视网膜下注射媒介物(第1组)、rAAV.SPR-X001(第2组和第3组)、rAAV.SPR-X001-3p(第4组和第5组)、rAAV.SPR-X001-5p(第6组和第7组)或rAAV.SPR-X002-3p(第8组和第9组)载体。载体以1.0 x 10^{11}个vg/mL;1.0 x 10^{8}个vg/眼(第2、4、6、8组)或5.0x10^{11}个vg/mL;5.0 x 10^{8}个vg/眼(第3、5、7、9组)。对侧的眼睛保持未注射。在注射后约1个月和2个月分别经由OCT和ERG评估视网膜结构和功能。在注射后约3个月对动物实施安乐死。安乐死后,将视网膜冷冻切片并经由免疫组织化学评估RS1表达。

[0195] 表1研究设计

[0196]

组	动物数量	试验材料	载体剂量	
			vg/mL	vg/眼
1	10	媒介物（ BSS + 0.014% Tween-20）	N/A	N/A
2	10	rAAV.SPR -X001	1.0 x 10^{11}	1.0 x 10^{8}
3	10	rAAV.SPR-X001	5.0 x 10^{11}	5.0 x 10^{8}
4	10	rAAV.SPR-X001-3p	1.0 x 10^{11}	1.0 x 10^{8}
5	10	rAAV.SPR-X001-3p	5.0 x 10^{11}	5.0 x 10^{8}
6	10	rAAV.SPR-X001-5p	1.0 x 10^{11}	1.0 x 10^{8}
7	10	rAAV.SPR-X001-5p	5.0 x 10^{11}	5.0 x 10^{8}
8	10	rAAV.SPR-X002-3p	1.0 x 10^{11}	1.0 x 10^{8}
9	10	rAAV.SPR-X002-3p	5.0 x 10^{11}	5.0 x 10^{8}

[0197] OCT分析揭示了载体处理的眼中劈裂腔的分辨(图10)。除了用低剂量rAAV.SPR-X001-5p处理并在注射后1个月评估的眼睛之外,在两个时间点,媒介物处理的眼睛与载体处理的眼睛之间的视网膜劈裂评分存在统计学上的显著差异。在1×10^{11}个vg/mL(1.0×10^{8}个vg/眼)的浓度下,相对于仅注射媒介物的眼,rAAV.SPR-X002-3p导致视杆和视锥介导的功能的显著改善(图11A)。在5×10^{11}个vg/mL(5.0×10^{8}个vg/眼)的较高浓度下,相对于注射媒介物的对照,所有三种填充构建体均赋予视网膜功能的显著改善(图11B)。在该较高剂量下,在用携带填充构建体与未填充构建体的rAAV.SPR注射的眼睛之间没有观察到ERG振幅的显著差异。

[0198] 免疫组织化学分析揭示来自用rAAV.SPR-X002-3p处理的RS1KO小鼠眼睛的视网膜的光感受器内段中存在RS1表达。对侧未处理的眼睛和仅用媒介物处理的那些眼睛不存在RS1表达(图12A-12B)。

[0199] 虽然本文已经示出和描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域技术人员显

而易见的是,此类实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现在将构思到许多变化、改变和替换。应当理解,在实践本发明时可以采用本文所描述的本发明的实施方案的各种替代方案。以下权利要求书旨在限定本发明的范围,并且由此涵盖在这些权利要求及其等同物的范围内的方法和结构。

[0200] 序列

[0201]

#	序列	注解
1	ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct	ITR
2	gggccccagaagcctggtggttgtttgtccttctcaggggaaaagtgaggcggccccttggaggaaggggccgggcagaatgatctaatcggattccaagcagctcaggggattgtctttttctagcaccttcttgccactcctaagcgtcctccgtgaccccggctgggatttagcctggtgctgtgtcagccccggtctcccaggggcttcccagtggtccccaggaaccctcgacaggggcccggtctctctcgtccagcaagggcagggacgggccacaggccaagggc	hGRK1启动子
3	tctagaggatccggtactcgaggaactgaaaaaccagaaagttaactggtaagtttagtctttttgtcttttatttcaggtcccggatccggtggtggtgcaaatcaaagaactgctcctcagtggatgttgcctttacttctaggcctgtacggaagtgttac	SV40SD/SA
4	atgtcacgcaagatagaaggctttttgttattacttctctttggctatgaagccacattgggatatcgtctaccgaggatgaaggcgaggacccatggtatcaaaaagcctgcaagtgcgattgccaaggaggacccaatgctctgtggtctgcaggtgccacctccttggactgtataccagaatgcccatatcacaagcctctgggtttcgagtcaggggaggtcacaccggaccagatcacctgctctaacccggagcagtatgtgggctggtattcttcgtggactgcaaacaaggccccggctcaacagtcaaggctttgggtgtgcctggctctccaagttccaggacagtagccagtggttacagatagatctgaaggagatcaaagtgatttcaggcatcctcacccaggggcgctgtgacatcgatgagtggatgaccaagtacagcgtgcagtacaggaccgatgagcgcctgaactggatttactacaaggaccagactggaaacaaccgggtcttctatggcaactcggaccgcacctccacggttcagaacctgctgcggcccccatcatctcccgcttcatccgcctcatcccgctgggctggcacgtccgcattgccatccggatggagctgctggagtgcgtcagcaagtgtgcctgag	RS1
5	tcgacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcatttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtccttccttggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcg	WPRE
6	tcgactagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaaggggggaggattgggaagacaatagcaggcatc	pGHpolyA
7	cagtggtccctgcctggagtttgaagggctgtcaaagacattgtggtcacttactcaagtg	填充

[0202]

	gtaaattccttacagactggactgcagttaagggtgataacgctactactaggacaagggt atccttgatcctgtggatctgtagtgacctgagactgtcaaggtatggtgagtatgaccctt gacccttccaacggttgtaaccgtgggcgctgtcaaatctgattaaccactactaggata gaatttggcagagctactgaaatggttacctggtcaagagactggcccacagcataaggg cgagcaagacgatgctcagattaactaagtgaccgaagtatcctagatggtccactacca gcaaatgtgtcagacctccctcagttggtagtacaatgtatccttctagtcgcgacttattata tcgacgagcttatgtgtaagagaccagattctttgtaacctgacacttgagttcaaggtgtgt agtaggagagtgcaaaccctgaagcaacagtagccgaaccgggtcgaggacctagcgt tgattgactttgtctggtgtatcctgtaaatttctccaatcgagatcgaggtaaagtggacctc acaggactttatcaaacaacagagttaatacctcaaatctctcgctgatatatgtgacaaatt cattgcgtcacttatcgcagctatgttcggtcagcatattctggcgaacacccacgctgca gttcgacaaggatagtatctggcgctctcgcccaattcaagcacgcgaattactctattaac ttgttgtctcttgtgtatatcataatcaattcctcctagttagtgattgaagacgaccgtgcact tggctgccttgatgcagaccacttcttgtggccggcacaccctataatagagatgtgataa ataacttagctggactgtagttatttcgtcctagggattctgacgggtgcaaatcactaagtg tctttggtattgggtctgtaacaatgttgagaactgtggtgtatgtacgaacgatgtgatctgt agactacagcacagggtattgctgtttcgcaccagtgtgacacttgtgtggctgtcctctgt gctatagcgccgtatatcttatgcaggttgtatagcccaacgactgtttaggtacgtccgtat aagaataggagtgctacactctacattgaatctatccagagagagttctgtagaattaggtg acgaacaaatctacgcgataggaaggagagacctggttgtcccaagggccgtgggtatg atgtttagtacaactaggaggctctaggtgtattggttgttggtcacgtagtgtccctacttg gtcaggactaaagtttgtcagtgaactctctactattattcatcgaacctgtggtcgtcggcg gtctgatatatgctcggtagattgcccgacaggacgtgaaggagcctaactattaaagcac tctaactagcctatcgtaacaacttatattgggtatttgggtacgacggtgtactggaaatct atctaattcttctgatcgtatatcgggtcgtatattgatttatgacggaccgaccactcacgc ggtccgatacgcggtagcgctatccaggaccctcttatgaattggtatcaatagattgtgg aacttgttgcgtacactacagaatgtctttgcaaagaatgccaaattacaagctatagtcctc ccactatactgcttcgtgactccaactagggtagttatagttgttcaagactggtactctgtta ccaattagtagcgatattgtgtgggatactggtgtctgtcatacgagaactgggagtagcg ctgtaaattctaaatagtcacactgttccagctggacgaccgctgtgtactctttgtagaaac tcactgcggcttccacttatgagatttggttataggtcacaaagtggcagtccagttgcagg tctcttgttgtaatatgactggattgaattgactaggaagacgtagtctgttcttgttaggtcc gacgtggtcccaatttgcttatccaatatgaggtcctagttagcagtcgctccgaggtcgaa atagataccttgtggtttcgtagattgtctgattcgcaacaatatcctgctaatcaatctacg gaaacaccgcttcagaggaagattgcgacggacagaagagtcaggcgcgccttgcatg c	物（在ITR内）
8	catgaccgagtaacgactcagtcgtcccacgaggcataagccagctgtaataagcgtac aagcgcacacacttgagtgggacaccttagggattcccaataattcggcaatctactgtga tacgacacttcagaaacgatgacctgaccgacaagctgaactctacttcacctactactca acactacaaccagtcctctgttgacagtataacttgttggtactattatgactgaagggtagg tttgattggatttgtttgcttcgtctggtcagcaggaggatctctcctttatacctgcagataac	骨架填充物(1)

[0203]

cgacgggtgcctattgtatcgaagtcattactacatccacctggtccacttgataaatcaatc
caaccgatacctacctgactaaggtcccttcacgaggacctttgtcacccagtaatcagatt
tagaagtcgtattcttacacaacctcacaactgattctgaacgcaccgtcgaagtcaacac
cacagtatctgaggaagtaagaacagtttgtactttgagcggcgcccactgtgaatacga
gagactttaggtcactttcaactatttagtgggtcaccttcggaactcagacgaggacacc
accacagtagaggtggatagtccaaacacagttgttgtacagacccagtggattgaatag
gatcttgatcaggtgtgtccagacgctccagactatagttaaataggagtaagaccgctaa
gcgcagcaggagttcccaatcgttacaactagatcctgtggtgatatatctagtgtccgact
tacatgcggcctctgtattagttcatattcattggtctgcacgcctcaggagagatattcgac
ctgaggataccaggacactttggatcagtatgggtcggaccagttgaacactgataaagt
actgaccgagtgggttgtgacggcccagagattcagtcctactttctcaactggagagga
accacctgttctgagtaacccacaatcgtgtccagagactggacaacactgaatgcaggtt
cctttctgttcacccagataagggagaccacactaagtggtgtattcgcacgacgatactg
gtgtcatttatttccctggccagtgtgtacctgcgtgactgcttccgaaggagtgttacaag
gagaaaggagagtataactacaaggaatgtagacactgcctgcagcccatgaattgcaat
ataatcggacttgctcggagtccctctactacttaggaagaggattgatcaccacaggtcc
tctggtcagtttaggatgcataatgatccatgccgagacttggaattgatatatactggtatc
accgtataggttgctggttgtagtgtctttagcccacccagtgtaatagcatgtatagttaatc
tgcgtaacgatccctacgaacgacctagaggtcagtcacaccacggcgcgaagaagac
tcttacactaatagtaagctattgtatctagttaagtgaccaacccatttggttcacatcgtag
ttgactttccgggtccttggacccgaaattctatcacatcagtccctaatgcgatgagtgcgt
ctttctggttcacgtggtctgtatcatcaattcctaaatcttagtgactaattattatttcgagac
attgtacacctggatggtactgtttctgtcccacgccctacaacggacaaccaacaacgca
ccttgttgaacaacaatgatccactacacaagctccgaggtcgttctcgtcttgatttgaaac
atgggtgcaatgtgtattagaggtttcaatccatatatcctaatacgttgatattgttctttagta
ggtggctcctaaagctcaaagttgcaagcaagctaacaataccatttcacgacaaggagg
ataaccacgtgtgttattctgactccatgtaatctgctaatcccaccttcttcagtcgagcttta
ttatattcgcgtaccggagacccaggcagaggtgaggacgaatatgttgcaggagtaaa
gaagctattgaaggatttcttaggacgcgctgctggtgttctaaagtagtatagaagctaag
tcaagccggagcatactccgatatttggagcctgataccagttactgggtgtttagcagaa
gcgttacgtgacttacacgatataatgactatacttgatctgaaggcatcaagtatcaacga
aagtcctttctgattgacaaacagactctcactttacagggataggattggaaccaccaatc
tgaggtattcaccagtatccagccactgctctctcaagtccaacgtaatccaaggagactc
cggcaattccttaattggcgttagctactgtgttgcgagcatttattactatctggcaaggag
tgacaaattagcaggattgattgaggtttgtgatccaccagaaggaaggactcaccgttag
gtatggtgaagatacccagcttgtgctgactgaggatagcaagacagatcacttatcactc
gaacagatcggacccaccgcacacctcaatatctctttaggaccaattcaagaacaactta
gacgctgtacacttaaacagcacagctgtgggtaagagaagtaatagagcgcgatatca
gcagcagcctcttgtagatcggcttcaagatatctatgtgtggaaataggtcactagagtg
agcggtactttcgctcttacaggtttgaaaggtcttagcagcgctatttagcgagtcctgga
gaccacgacaacgagcgctgtggtcctcacaaataggaccaacaataacaatacaggat

[0204]

	ttatcaagagatagaagtcggtataccgattctgctgtttcgtagtcggctacagatcaata gattattgtgttcagattagttgaggaagttgaatgggtcaaggaccttacctaataccaggt caccggacttggtaattttccctcttggggttggtgagtagtactgtctaccaactggtgact ggtgatcccttacttgtttggaccct	
9	tgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttttt ccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggc gaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgct ctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtg gcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctg ggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgt cttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacag gattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaacta cggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgga aaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgt ttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttcta cggg	复制起点(pUC)
10	atgagccatattcaacgggaaacgtcgaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatt tatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgctt gtatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaa tgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgcctcttccgacca tcaagcattttatccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccggaaaa acagcattccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggc agtgttcctgcgccggttgcattcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgtat ttcgtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtttggttgatgcgagtgattttgat gacgagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaacttttgccat tctcaccggattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggg gaaattaataggttgtattgatgttggacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatctt gccatcctatggaactgcctcggtgagttttctccttcattacagaaacggctttttcaaaaat atggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgctcgatgagtttttctaa	Kan R
11	ccctgttggttcaagtctccctaatagtttgaggggaaggagttggtgtcaagggtctgac caccatattacgggactagagacaggtggaggtctggacaccctattggtggatcattcat tatggatacggtcctggacaagtggactgatcccaattaggagactggtccagtgtccca ccttgagaggtactgatactcacttacctcaaacactaggttcttaagagggtgatggaga gagattaggaccaaaccagagactttggtcctaactccagaggtagtgagtacaaaacac cactaggtgaggttgggaccagtctattttctccaaactgagaaggtgtcagtggaggcac acttaccctctcactgg	骨架填充物(2)
12	atgtcagtttcctcctgttcctgtccatccgcacccactatcttcatgttgttgcagatgaagc gcgcaagaccgtctgaagataccttcaaccccgtgtatccatatgacacggaaaccggtc ctccaactgtgccttttcttactcctccctttgtatccccccaatgggtttcaagagagtccccc tggggtactctctttgcgcctatccgaacctctagttacctccaatggcatgcttgcgctcaa aatgggcaacggcctctctctggacgaggccggcaaccttacctcccaaaatgtaacca	Fiber

[0205]

	ctgtgagcccacctctcaaaaaaaccaagtcaaacataaacctggaaatatctgcaccct cacagttacctcagaagccctaactgtggctgccgccgcacctctaatggtcgcgggcaa cacactcaccatgcaatcacaggccccgctaaccgtgcacgactccaaacttagcattgc cacccaaggacccctcacagtgtcagaaggaaagctagccctgcaaacatcaggcccc ctcaccaccaccgatagcagtacccttactatcactgcctcacccccctctaactactgcca ctggtagcttgggcattgacttgaaagagcccatttatacacaaaatggaaaactaggact aaagtacggggctcctttgcatgtaacagacgacctaaacactttgaccgtagcaactggt ccaggtgtgactattaataatacttccttgcaaactaaagttactggagccttgggttttgatt cacaaggcaatatgcaacttaatgtagcaggaggactaaggattgattctcaaaacagac gccttatacttgatgttagttatccgtttgatgctcaaaaccaactaaatctaagactaggac agggccctcttttataaactcagcccacaacttggatattaactacaacaaaggcctttact tgtttacagcttcaaacaattccaaaaagcttgaggttaacctaagcactgccaaggggttg atgtttgacgctacagccatagccattaatgcaggagatgggcttgaatttggttcacctaa tgcaccaaacacaaatcccctcaaaacaaaaattggccatggcctagaatttgattcaaac aaggctatggttcctaaactaggaactggccttagttttgacagcacaggtgccattacagt aggaaacaaaaataatgataagctaactttgtggaccacaccagctccatctcctaactgt agactaaatgcagagaaagatgctaaactcactttggtcttaacaaaatgtggcagtcaaa tacttgctacagtttcagttttggctgttaaaggcagtttggctccaatatctggaacagttca aagtgctcatcttattataagatttgacgaaaatggagtgctactaaacaattccttcctgga cccagaatattggaactttagaaatggagatcttactgaaggcacagcctatacaaacgct gttggatttatgcctaacctatcagcttatccaaaatctcacggtaaaactgccaaaagtaa cattgtcagtcaagtttacttaaacggagacaaaactaaacctgtaacactaaccattacac taaacggtacacaggaaacaggagacacaactccaagtgcatactctatgtcattttcatg ggactggtctggccacaactacattaatgaaatatttgccacatcctcttacacttttcatac attgcccaagaataa	
13	agctcagtttcctcctgttcctgtccatccgcacccactatcttcatgttgttgcagtaaaagc gcgcaagaccgtctgaagataccttcaaccccgtgtatccatatgacacggaaaccggtc ctccaactgtgccttttcttactcctccctttgtatccccccaatgggtttcaagagagtccccc tggggtactctctttgcgcctatccgaacctctagttacctccaatggcattcttgcgctcaa aataggcaacggcctctctctggacgaggccggcaaccttacctcccaaaatgtaaccac tgtgagcccacctctcaaaaaaaaccaagtcaaacataaacctggaaatatctgcaccctc acagttacctcagaagccctaactgtggctgccgccgcacctctaatcgtcgcgggcaac acactcaccatacaatcacaggccccgctaaccgtgcacgactccaaacttagcattgcc acccaaggacccctcacagtgtcagaaggaaagctagccctgcaaacatcaggcccct caccaccaccgatagcagtacccttactatcactgcctcacccccctctaactactgccact ggtagcttgggcattgacttgaaagagcccatttatacacaaaatggaaaactaggactaa agtacggggctcctttgcatgtaacagacgacctaaacactttgaccgtagcaactggtcc aggtgtgactattaataatacttccttgcaaactaaagttactggagccttgggttttgattca caaggcaatctgcaacttaatgtagcaggaggactaaggattgattctcaaaacagacgc cttatacttgatgttagttatccgtttgatgctcaaaaccaactaaatctaagactaggacag ggccctcttttataaactcagcccacaacttggatattaactacaacaaaggcctttacttgt	突变的Fiber

[0206]

	ttacagcttcaaacaattccaaaaagcttgaggttaacctaagcactgccaaggggttgat atttgacgctacagccatagccattaatgcaggagatgggcttgaatttggttcacctaatg caccaaacacaaatcccctcaaaacaaaaattggccatggcctagaatttgattcaaacaa ggctattgttcctaaactaggaactggccttagttttgacagcacaggtgccattacagtag gaaacaaaaataatgataagctaactttgtggaccacaccagctccatctcctaactgtag actaaatgcagagaaagatgctaaactcactttggtcttaacaaaatgtggcagtcaaata cttgctacagtttcagttttggctgttaaaggcagtttggctccaatatctggaacagttcaaa gtgctcatcttattataagatttgacgaaaatggagtgctactaaacaattccttcctggacc cagaatattggaactttagaaatggagatcttactgaaggcacagcctatacaaacgctgtt ggattttaacctaacctatcagcttatccaaaatctcacggtaaaactgccaaaagtaacatt gtcagtcaagtttacttaaacggagacaaaactaaacctgtaacactaaccattacactaaa cggtacacaggaaacaggagacacaactccaagtgcatactctatgtcattttcatgggac tggtctggccgctagcacaactacattaatgaaatatttgccacatcctcttacacttttcat acattgcccaagaataa	
21	AADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQ DDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDK AYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFERLQEDTSFGGNLGR AVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDS SSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATP AAVGTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDST WLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNH YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQLINNNWGFRPKRL NFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSDSEYQLP YVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRS SFYCEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVPFHSSYAHSQSLD RLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGM SVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTNNNSNFTWTGASKYN LNGRESIINPGTAMASHKDDEDKFFPMSGVMIFGKESAG ASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSTD PATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG HFHPSPLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFA SFITQYSTGQVSVEIEWEQKENSKRWNPEVQYTSNYAKS ANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL	AA V1 衣壳
22	AADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHK DDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDK AYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFERLKEDTSFGGNLGR AVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDS SSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAA PSGLGNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDS TWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQLINNNWGFRPKRL	AA V2 衣壳

[0207]

	NFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLP YVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGR SSFYCEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSL DRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDI RDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSANNNSEYSWTGATKYH LNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRNRQ AATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG HFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFA SFITQYSTGQVSVEIEWEQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSV NVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL	
23	AADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQ DNRRGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDK AYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFERLQEDTSFGGNLGR AVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQEPDS SSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAP TSLGNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQ WLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHY FGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQLINNNWGFRPKKLS FKLFNIQVRGVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPY VLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSS FYCEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDR LMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSM SLQARNWLPGPCYRQQRLSKTANNNNSNFPWTAASKYH LNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTT ASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSNT APTTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG HFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFA SFITQYSTGQVSVEIEWEQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSV NVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL	AA V3 衣壳
24	MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQH QDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHD KAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQRLQGDTSFGGNLG RAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQPDS STGIGKKGKQPAKKKLVFEDETGAGDGPPEGSTSGAMSD DSMRAAAGGAAVEGGQGADGVGNASGDWHCDSTWSE GHVTTTSTRTWVLPTYNNHLYKRLGESLQSNTYNGFSTP WGYFDFNRFHCHFSPRDWQLINNNWGMRPKAMRVKIFN IQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSSYELPYVMDAG QEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGLVTGNTSQQQTDRNAFY CEYFPSQMLRTGNNFEITYSFEKVPFHSMYAHSQSLDRL	AA V4 衣壳

[0208]

	MNPLIDQYLWGLQSTTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFS NFKKNWLPGPSIKQQGFSKTANNYKIPATGSDSLIKYETH STLDGRWSALTPGPPMATAGPADSKFSNSQLIFAGPKQN GNTATVPGTLIFTSEEELAATNATDTDMWGNLPGGDQSS NLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPIWAKIPHTD GHFHPSPLIGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPATTFSSTPVN SFITQYSTGQVSVQIDWEQKERSKRWNPEVQFTSNYGQQ NSLLWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL	
25	SFVDHPPDWLEEVGEGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQ ARGLVLPGYNYLGPGNGLDRGEPVNRADEVAREHDISY NEQLEAGDNPYLKYNHADAEFEKLADDTSFGGNLGKAV FQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKART EEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGDTMSAGG GGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKST RTWVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGY FDFNRFHSHWSPRDWQLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVK EVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEG CLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCEYFPS KMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQ YLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGR TQGWNLGSGNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNG MTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLI TSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSTTAPATGTYNLQ EIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGAHFHPSPAMGGF GLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVT VEMEWEKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTG EYRTTRPIGTRYLTRPL	AA V5 衣壳
26	AADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQ DDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDK AYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFERLQEDTSFGGNLGR AVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDS SSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATP AAVGTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDST WLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNH YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQLINNNWGFRPKRL NFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSDSEYQLP YVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRS SFYCEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLD RLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGM SVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTNNNSNFTWTGASKYN	AA V6 衣壳

[0209]

	LNGRESIINPGTAMASHKDDKDKFFPMSGVMIFGKESAG ASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSTD PATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG HFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFA SFITQYSTGQVSVEIEWEQKENSKRWNPEVQYTSNYAKS ANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL	
27	AADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQ DNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDK AYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFERLQEDTSFGGNLGR AVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPSPQRSPD SSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAA PSSVGGTVAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDS TWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSETAGSTNDN TYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQLINNNWGFRPKK LRFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTIQVFSDSEYQLP YVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQSVGRS SFYCEYFPSQMLRTGNNFEFSYSFEDVPFHSSYAHSQSLD RLMNPLIDQYLYYLARTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPST MAEQAKNWLPGPCFRQQRVSKTLDNNNSNFAWTGATK YHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDEDRFFPSSGVLIFGKTG ATNKTTLENVLMTNEEEIRPTNPVATEEYGIVSSNLQANT AAQTQVVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTD GNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPEVFTPAKF ASFITQYSTGQVSVEIEWEQKENSKRWNPEIQYTSNFEKQ TGVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTRNL	AA V7 衣壳
28	AADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQ DDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDK AYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFERLQEDTSFGGNLGR AVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPD SSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAA PSGVGNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDS TWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATND NTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQLINNNWGFRPK RLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQL PYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGR SSFYCEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSL DRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNT MANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGNNNSNFAWTAGTK YHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSNGILIFGKQNA ARDNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQN TAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTD	AA V8 衣壳

[0210]

	GNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKL NSFITQYSTGQVSVEIEWEQKENSKRWNPEIQYTSNYYKS TSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	
29	AADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQ DNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDK AYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFERLKEDTSFGGNLGR AVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDS SAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAP SGVGLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQ WLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDN AYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQLINNNWGFRPK RLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDY QLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAV GRSSFYCEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQ SLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSN MAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTNNNSEFAWPGASSW ALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGT GRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSQ AQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTD GNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDK LNSFITQYSTGQVSVEIEWEQKENSKRWNPEIQYTSNYYK SNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	AA V9 衣壳
30	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQ KQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEH DKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGN LGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQR SPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPIGEP PAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNW HCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGG STNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNN WGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVF TDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNN GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYQFEDVPFHS SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLL FSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSN FAWTGATKYHLNGRDSLVNPGVAMATHKDDEERFFPSS GVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQ YGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVY LQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPV PADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR WNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTDGTYSEPRPIGTRYLTR	AA V10 衣壳

		NL	
	31	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQ KQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEH DKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGN LGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPLGEPP AAPSGLGPNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWH CDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGS TNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNW GFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNEGTKTIANNLTSTVQVFT DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG SQALGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSS YAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLVRTQTTGTGGTQTLAFS QAGPSSMASQARNWVPGPSYRQQRVSTTTNQNNNSNFA WTGAAKFKLNGRDSLMNPGVAMASHKDDDDRFFPSSGV LIFGKQGAGNDGVDYSQVLITDEEEIKATNPVATEEYGA VAINNQAANTQAQTGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYLQG PIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPAD PPLTFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP EIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	AA V44. 9(E5 31D)
[0211]	32	ggcctcttcgcttaattaacgccaggctgcaggttggccactccctctctgcgcgctcgct cgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccgg cctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttc ctcagatctgaattcggtaccgggccccagaagcctggtggttgtttgtccttctcagggg aaaagtgaggcggccccttggaggaaggggccgggcagaatgatctaatcggattcca agcagctcaggggattgtctttttctagcaccttcttgccactcctaagcgtcctccgtgacc ccggctgggatttagcctggtgctgtgtcagccccggtctcccaggggcttcccagtggt ccccaggaaccctcgacagggcccggtctctctcgtccagcaagggcagggacgggc cacaggccaagggctctagaggatccggtactcgaggaactgaaaaaccagaaagtta actggtaagtttagtcttttgtcttttatttcaggtcccggatccggtggtggtgcaaatcaa agaactgctcctcagtggatgttgcctttacttctaggcctgtacggaagtgttacttctgctc taaaagctgcggaattgtacccgcggccgccaccatgtcacgcaagatagaaggcttttt gttattacttctctttggctatgaagccacattgggattatcgtctaccgaggatgaaggcga ggacccatggtatcaaaaagcctgcaagtgcgattgccaaggaggacccaatgctctgt ggtctgcaggtgccacctccttggactgtataccagaatgcccatatcacaagcctctggg tttcgagtcaggggaggtcacaccggaccagatcacctgctctaacccggagcagtatgt gggctggtattcttcgtggactgcaaacaaggcccggctcaacagtcaaggctttgggtg tgcctggctctccaagttccaggacagtagccagtggttacagatagatctgaaggagat caaagtgatttcaggcatcctcacccaggggcgctgtgacatcgatgagtggatgaccaa gtacagcgtgcagtacaggaccgatgagcgcctgaactggatttactacaaggaccaga ctggaaacaaccgggtcttctatggcaactcggaccgcacctccacggttcagaacctgc	全长 序列

[0212]

tgcggccccccatcatctcccgcttcatccgcctcatcccgctgggctggcacgtccgcat
tgccatccggatggagctgctggagtgcgtcagcaagtgtgcctgagtcgacctctggat
tacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggata
cgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtat
aaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggt
gtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctc
ctttccgggactttcgctttcccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcct
tgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggg
gaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgt
ccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgcc
ggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgg
gccgcctcccccgcgtcgactagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgcca
gccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactg
tcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggg
gggtggggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatc
cagtggtccctgcctggagtttgaagggctgtcaaagacattgtggtcacttactcaagtg
gtaaattccttacagactggactgcagttaagggtgataacgctactactaggacaagggt
atccttgatcctgtggatctgtagtgacctgagactgtcaaggtatggtgagtatgacccctt
gacccctttccaacggttgtaaccgtgggcgctgtcaaatctgattaaccactactaggata
gaatttggcagagctactgaaatggttacctggtcaagagactggcccacagcataaggg
cgagcaagacgatgctcagattaactaagtgaccgaagtatcctagatggtccactacca
gcaaatgtgtcagacctccctcagttggtagtacaatgtatccttctagtcgcgacttattata
tcgacgagcttatgtgtaagagaccagattctttgtaacctgacacttgagttcaaggtgtgt
agtaggagagtgcaaaccctgaagcaacagtagccgaaccgggtcgaggacctagcgt
tgattgactttgtctggtgtatcctgtaaatttctccaatcgagatcgaggtaaagtggacctc
acaggactttatcaaacaacagagttaatacctcaaatctctcgctgatatatgtgacaaatt
cattgcgtcacttatcgcagctatgttcggtcagcatattctggcgaacacccacgctgca
gttcgacaaggatagtatctggcgctctcgcccaattcaagcacgcgaattactctattaac
ttgttgtctcttgtgtatatcataatcaattcctcctagttagtgattgaagacgaccgtgcact
tggctgccttgatgcagaccacttcttgtggccggcacaccctataatagagatgtgataa
ataacttagctggactgtagttatttcgtcctagggattctgacgggtgcaaatcactaagtg
tctttggtattgggtctgtaacaatgttgagaactgtggtgtatgtacgaacgatgtgatctgt
agactacagcacagggtattgctgtttcgcaccagtgtgacacttgtgtggctgtcctctgt
gctatagcgccgtatatcttatgcaggttgtatagcccaacgactgtttaggtacgtccgtat
aagaataggagtgctacactctacattgaatctatccagagagagttctgtagaattaggtg
acgaacaaatctacgcgataggaaggagagacctggttgtcccaagggccgtgggtatg
atgtttagtacaactaggaggctctaggtgtattggttgttggtcacgtagtgtccctacttg
gtcaggactaaagtttgtcagtgaactctctactattattcatcgaacctgtggtcgtcggcg
gtctgatatatgctcggtagattgcccgacaggacgtgaaggagcctaactattaaagcac
tctaactagcctatcgtaacaacttatattgggtatttgggtacgacggtgtactggaaatct
atctaattcttctgatcgtatatcgggtcgtatattgatttatgacggaccgaccactcacgc

[0213]

ggtccgatacgcggtagcgctatccaggaccctcttatgaattggtatcaatagattgtgg
aacttgttgcgtacactacagaatgtctttgcaaagaatgccaaattacaagctatagtcctc
ccactatactgcttcgtgactccaactagggtagttatagttgttcaagactggtactctgtta
ccaattagtagcgatattgtgtgggatactggtgtctgtcatacgagaactgggagtagcg
ctgtaaattctaaatagtcacactgttccagctggacgaccgctgtgtactctttgtagaaac
tcactgcggcttccacttatgagatttggttataggtcacaaagtggcagtccagttgcagg
tctcttgttgtaatatgactggattgaattgactaggaagacgtagtctgttcttgttaggtcc
gacgtggtcccaatttgcttatccaatatgaggtcctagttagcagtcgctccgaggtcgaa
atagataccttgtggtttcgtagattgtctgattcgcaacaatatcctgctaatcaatctacg
gaaacaccgcttcagaggaagattgcgacggacagaagagtcaggcgcgccttgcatg
ctggggagagatctgaggaaccccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctc
gctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccggg
cggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaacctgcagcctgctt
aattaatcatatgcatgaccgagtaacgactcagtcgtcccacgaggcataagccagctgt
aataagcgtacaagcgcacacacttgagtgggacaccttagggattcccaataattcggc
aatctactgtgatacgacacttcagaaacgatgacctgaccgacaagctgaactctacttc
acctactactcaacactacaaccagtcctctgttgacagtataacttgttggtactattatgac
tgaagggtaggtttgattggatttgtttgcttcgtctggtcagcaggaggatctctcctttata
cctgcagataaccgacgggtgcctattgtatcgaagtcattactacatccacctggtccact
tgataaatcaatccaaccgatacctacctgactaaggtcccttcacgaggacctttgtcacc
cagtaatcagatttagaagtcgtattcttacacaacctcacaactgattctgaacgcaccgt
cgaagtcaacaccacagtatctgaggaagtaagaacagtttgtactttgagcggcgccca
ctgtgaatacgagagactttaggtcactttcaactatttagtgggtcaccttcggaactcaga
cgaggacaccaccacagtagaggtggatagtccaaacacagttgttgtacagacccagt
ggattgaataggatcttgatcaggtgtgtccagacgctccagactatagttaaataggagt
aagaccgctaagcgcagcaggagttcccaatcgttacaactagatcctgtggtgatatatc
tagtgtccgacttacatgcggcctctgtattagttcatattcattggtctgcacgcctcagga
gagatattcgacctgaggataccaggacactttggatcagtatgggtcggaccagttgaa
cactgataaagtactgaccgagtgggttgtgacggcccagagattcagtcctactttctca
actggagaggaaccacctgttctgagtaacccacaatcgtgtccagagactggacaaca
ctgaatgcaggttcctttctgttcacccagataagggagaccacactaagtggtgtattcgc
acgacgatactggtgtcatttatttccctggccagtgtgtacctgcgtgactgcttccgaag
gagtgttacaaggagaaaggagagtataactacaaggaatgtagacactgcctgcagcc
catgaattgcaatataatcggacttgctcggagtccctctactacttaggaagaggattgat
caccacaggtcctctggtcagtttaggatgcataatgatccatgccgagacttggaattgat
atatactggtatcaccgtataggttgctggttgtagtgtctttagcccacccagtgtaatagc
atgtatagttaatctgcgtaacgatccctacgaacgacctagaggtcagtcacaccacggc
gcgaagaagactcttacactaatagtaagctattgtatctagttaagtgaccaacccatttg
gttcacatcgtagttgactttccgggtccttggacccgaaattctatcacatcagtccctaat
gcgatgagtgcgtctttctggttcacgtggtctgtatcatcaattcctaaatcttagtgactaa
ttattatttcgagacattgtacacctggatggtactgtttctgtcccacgccctacaacggac

[0214]

aaccaacaacgcaccttgttgaacaacaatgatccactacacaagctccgaggtcgttctc
gtcttgatttgaaacatgggtgcaatgtgtattagaggtttcaatccatatatcctaatacgtt
gatattgttctttagtaggtggctcctaaagctcaaagttgcaagcaagctaacaataccatt
tcacgacaaggaggataaccacgtgtgttattctgactccatgtaatctgctaatcccaccttt
cttcagtcgagctttattatattcgcgtaccggagacccaggcagaggtgaggacgaatat
gttgcaggagtaaagaagctattgaaggatttcttaggacgcgctgctggtgttctaaagta
gtatagaagctaagtcaagccggagcatactccgatatttggagcctgataccagttactg
ggtgtttagcagaagcgttacgtgacttacacgatataatgactatacttgatctgaaggca
tcaagtatcaacgaaagtcctttctgattgacaaacagactctcactttacagggataggatt
ggaaccaccaatctgaggtattcaccagtatccagccactgctctctcaagtccaacgtaa
tccaaggagactccggcaattccttaattggcgttagctactgtgttgcgagcatttattact
atctggcaaggagtgacaaattagcaggattgattgaggtttgtgatccaccagaaggaa
ggactcaccgttaggtatggtgaagatacccagcttgtgctgactgaggatagcaagaca
gatcacttatcactcgaacagatcggacccaccgcacacctcaatatctctttaggaccaa
ttcaagaacaacttagacgctgtacacttaaacagcacagctgtgggtaagagaagtaata
gagcgcgatatcagcagcagcctcttgtagatcggcttcaagatatctatgtgtggaaata
ggtcactagagtgagcggtactttcgctcttacaggtttgaaaggtcttagcagcgctattta
gcgagtcctggagaccacgacaacgagcgctgtggtcctcacaaataggaccaacaat
aacaatacaggatttatcaagagatagaagtcggtataccgattctgctgtttcgtagtcgg
ctacagatcaatagattattgtgttcagattagttgaggaagttgaatgggtcaaggacctta
cctaataccaggtcaccggacttggtaattttccctcttggggttggtgagtagtactgtcta
ccaactggtgactggtgatcccttacttgtttggaccctggtaatacggttatccacagaatc
aggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacc
gtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcaca
aaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggc
gtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacc
tgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctca
gttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccg
accgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatc
gccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgct
acagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctg
cgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaa
accaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaag
gatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactca
cgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttcacgtag
aaacccagtccgcagaaacggtgctgaccctgatgaatgtcacctactgggttatctgg
acaagggaaaacccaagcgcaaagagaaagcaggtagcttggagtggggttacatggt
gataggtagactgggaggttttatggacaggaaccgaacctcaattcccaggtggggtgt
cctctggtaaggttgggaagtcctggaaagtaaactggatggctttctcgccgctgttacat
tgcacaagataaaaatatatcatcatgaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaata
caaggggtgttatgagccatattcaacgggaaacgtcgaggccgcgattaaattccaaca

		tggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgac aatctatcgcttgtatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggt agcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgc ctcttccgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcga tccccggaaaaacagcattccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattgtt gatgcgctggcagtgttcctgcgccggttgcattcgattcctgtttgtaattgtccttttaaca gcgatcgcgtatttcgtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtttggttgatgc gagtgattttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcat aaacttttgccattctcaccggattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttat ttttgacgaggggaaattaataggttgtattgatgttggacgagtcggaatcgcagaccga taccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtgagttttctccttcattacagaaacgg ctttttcaaaaatatggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgctcgat gagtttttctaaatttgttaaaatttttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccctgttg gttcaagtctccctaatagtttgaggggaaggagttggtgtcaagggtctgaccaccatatt acgggactagagacaggtggaggtctggacaccctattggtggatcattcattatggatac ggtcctggacaagtggactgatcccaattaggagactggtccagtgtcccaccttgagag gtactgatactcacttacctcaaacactaggttcttaagagggtgatggagagagattagg accaaaccagagactttggtcctaactccagaggtagtgagtacaaaacaccactaggtg aggttgggaccagtctattttctccaaactgagaaggtgtcagtggaggcacacttaccct ctcactggctattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcg	
[0215]	33	cctcttcgcttaattaacgccaggctgcaggttggccactccctctctgcgcgctcgctcg ctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcct cagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcctc agatctgaattcggtaccgggcccccagaagcctggtggttgtttgtccttctcaggggaaa agtgaggcggcccctggaggaaggggccgggcagaatgatctaatcggattccaagc agctcaggggattgtctttttctagcaccttcttgccactcctaagcgtcctccgtgaccccg gctgggatttagcctggtgctgtgtcagccccggtctcccaggggcttcccagtggtccc caggaaccctcgacagggcccggtctctctcgtccagcaagggcagggacgggccac aggccaagggctctagaggatccggtactcgaggaactgaaaaaccagaaagttaactg gtaagtttagtctttttgtctttttatttcaggtcccggatccggtggtggtgcaaatcaaagaa ctgctcctcagtggatgttgcctttacttctaggcctgtacggaagtgttacttctgctctaaa agctgcggaattgtacccgcggccgccaccatgtcacgcaagatagaaggctttttgttat tacttctctttggctatgaagccacattgggattatcgtctaccgaggatgaaggcgagga cccatggtatcaaaaagcctgcaagtgcgattgccaaggaggacccaatgctctgtggtc tgcaggtgccacctccttggactgtataccagaatgcccatatcacaagcctctgggtttc gagtcaggggaggtcacaccggaccagatcacctgctctaacccggagcagtatgtgg gctggtattcttcgtggactgcaaacaaggcccggctcaacagtcaaggctttgggtgtgc ctggctctccaagttccaggacagtagccagtggttacagatagatctgaaggagatcaa agtgatttcaggcatcctcacccaggggcgctgtgacatcgatgagtggatgaccaagta cagcgtgcagtacaggaccgatgagcgcctgaactggatttactacaaggaccagactg gaaacaaccgggtcttctatggcaactcggaccgcacctccacggttcagaacctgctgc	全长

[0216]

ggcccccatcatctcccgcttcatccgcctcatcccgctgggctggcacgtccgcattgc
catccggatggagctgctggagtgcgtcagcaagtgtgcctgagtcgactagagctcgct
gatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgcctt
ccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcg
cattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtggggtggggcaggacagcaagggg
gaggattgggaagacaatagcaggcatccgattcgagtgagcagaccacatgatgattg
gtattctccctgaagaaagaatgtcagcaaggagtatctgaagtccgaccaagcctagaa
tccgcccggttcttatttgctgaagtaatactgttgtcaagtcagctacagggagtggtccct
gcctggagtttgaagggctgtcaaagacattgtggtcacttactcaagtggtaaattcctta
cagactggactgcagttaagggtgataacgctactactaggacaagggtatccttgatcct
gtggatctgtagtgacctgagactgtcaaggtatggtgagtatgacccttgacccttccaa
cggttgtaaccgtgggcgctgtcaaatctgattaaccactactaggatagaatttggcaga
gctactgaaatggttacctggtcaagagactggcccacagcataagggcgagcaagac
gatgctcagattaactaagtgaccgaagtatcctagatggtccactaccagcaaatgtgtc
agacctccctcagttggtagtacaatgtatccttctagtcgcgacttattatatcgacgagctt
atgtgtaagagaccagattctttgtaacctgacacttgagttcaaggtgtgtagtaggagag
tgcaaaccctgaagcaacagtagccgaaccgggtcgaggacctagcgttgattgactttg
tctggtgtatcctgtaaatttctccaatcgagatcgaggtaaagtggacctcacaggacttta
tcaaacaacagagttaatacctcaaatctctcgctgatatatgtgacaaattcattgcgtcac
ttatcgcagctatgttcggtcagcatattctggcgaacacccacgctgcagttcgacaagg
atagtatctggcgctctcgcccaattcaagcacgcgaattactctattaacttgttgtctcttg
tgtatatcataatcaattcctcctagttagtgattgaagacgaccgtgcacttggctgccttg
atgcagaccacttcttgtggccggcacaccctataatagagatgtgataaataacttagctg
gactgtagttatttcgtcctagggattctgacgggtgcaaatcactaagtgtctttggtattgg
gtctgtaacaatgttgagaactgtggtgtatgtacgaacgatgtgatctgtagactacagca
cagggtattgctgtttcgcaccagtgtgacacttgtgtggctgtcctctgtgctatagcgcc
gtatatcttatgcaggttgtatagcccaacgactgtttaggtacgtccgtataagaatagga
gtgctacactctacattgaatctatccagagagagttctgtagaattaggtgacgaacaaat
ctacgcgataggaaggagagacctggttgtcccaagggccgtgggtatgatgtttagtac
aactaggaggctctaggtgtattggttgttggtcacgtagtgtccctacttggtcaggacta
aagtttgtcagtgaactctctactattattcatcgaacctgtggtcgtcggcggtctgatatat
gctcggtagattgcccgacaggacgtgaaggagcctaactattaaagcactctaactagc
ctatcgtaacaacttatattgggtatttgggtacgacggtgtactggaaatctatctaattctt
ctgatcgtatatcgggtcgtatattgatttatgacggaccgaccactcacgcggtccgatac
gcggtagcgctatccaggaccctcttatgaattggtatcaatagattgtggaacttgttgcgt
acactacagaatgtctttgcaaagaatgccaaattacaagctatagtcctcccactatactg
cttcgtgactccaactagggtagttatagttgttcaagactggtactctgttaccaattagtag
cgatattgtgtgggatactggtgtctgtcatacgagaactgggagtagcgctgtaaattcta
aatagtcacactgttccagctggacgaccgctgtgtactctttgtagaaactcactgcggct
tccacttatgagatttggttataggtcacaaagtggcagtccagttgcaggtctcttgttgta
atatgactggattgaattgactaggaagacgtagtctgttcttgttaggtccgacgtggtcc

[0217]

caatttgcttatccaatatgaggtcctagttagcagtcgctccgaggtcgaaatagataccc
ttgtggtttcgtagattgtctgattcgcaacaatatcctgctaatcaatctacggaaacaccg
cttcagaggaagattgcgacggacagaagagtcagtttcggctgcttgtggtttggcctaa
tataaagattacttacggcttaggtatactgcacatcctccggccttgtttggtgcttgagatt
ggtgcgcatatatgtaaggtgctatcgtatccgcctccagtacttgatcttgtcctgcggctt
tagggctgcttatccctccagcggtccaacctctgaagggtcaggccatacttcacctcctt
tgtctaggattctgttccgaatttccggtctgggtcatgtactctcaccatcgagtgtaggga
gacgattctcgtaacagccgtagccgaatcactttcacttgagtctatgggttgtgcctgag
ttctagcttagtatttaacaacggcgtcggtccaaagacggtacacacttaaccatagtgaa
cgaatgaaacagtaatcgctccaggttggcgcgccttgcatgctggggagagatctgag
gaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggcc
gggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgag
cgagcgcgcagagagggagtggccaacctgcagcctgcttaattaatcatatgcatgac
cgagtaacgactcagtcgtcccacgaggcataagccagctgtaataagcgtacaagcgc
acacacttgagtgggacaccttagggattcccaataattcggcaatctactgtgatacgac
acttcagaaacgatgacctgaccgacaagctgaactctacttcacctactactcaacacta
caaccagtcctctgttgacagtataacttgttggtactattatgactgaagggtaggtttgatt
ggatttgtttgcttcgtctggtcagcaggaggatctctcctttatacctgcagataaccgacg
ggtgcctattgtatcgaagtcattactacatccacctggtccacttgataaatcaatccaacc
gatacctacctgactaaggtcccttcacgaggacctttgtcacccagtaatcagatttagaa
gtcgtattcttacacaacctcacaactgattctgaacgcaccgtcgaagtcaacaccacag
tatctgaggaagtaagaacagtttgtactttgagcggcgcccactgtgaatacgagagact
ttaggtcactttcaactatttagtgggtcaccttcggaactcagacgaggacaccaccaca
gtagaggtggatagtccaaacacagttgttgtacagacccagtggattgaataggatcttg
atcaggtgtgtccagacgctccagactatagttaaataggagtaagaccgctaagcgcag
caggagttcccaatcgttacaactagatcctgtggtgatatatctagtgtccgacttacatgc
ggcctctgtattagttcatattcattggtctgcacgcctcaggagagatattcgacctgagg
ataccaggacactttggatcagtatgggtcggaccagttgaacactgataaagtactgacc
gagtgggttgtgacggcccagagattcagtcctactttctcaactggagaggaaccacct
gttctgagtaacccacaatcgtgtccagagactggacaacactgaatgcaggttcctttct
gttcacccagataagggagaccacactaagtggtgtattcgcacgacgatactggtgtcat
ttatttccctggccagtgtgtacctgcgtgactgcttccgaaggagtgttacaaggagaaa
ggagagtataactacaaggaatgtagacactgcctgcagcccatgaattgcaatataatc
ggacttgctcggagtccctctactacttaggaagaggattgatcaccacaggtcctctggt
cagtttaggatgcataatgatccatgccgagacttggaattgatatatactggtatcaccgta
taggttgctggttgtagtgtctttagcccacccagtgtaatagcatgtatagttaatctgcgta
acgatccctacgaacgacctagaggtcagtcacaccacggcgcgaagaagactcttaca
ctaatagtaagctattgtatctagttaagtgaccaacccatttggttcacatcgtagttgacttt
ccgggtccttggacccgaaattctatcacatcagtccctaatgcgatgagtgcgtctttctg
gttcacgtggtctgtatcatcaattcctaaatcttagtgactaattattatttcgagacattgtac
acctggatggtactgtttctgtcccacgccctacaacggacaaccaacaacgcaccttgtt

[0218]

gaacaacaatgatccactacacaagctccgaggtcgttctcgtcttgatttgaaacatgggt
gcaatgtgtattagaggtttcaatccatatatcctaatacgttgatattgttctttagtaggtgg
ctcctaaagctcaaagttgcaagcaagctaacaataccatttcacgacaaggaggataac
cacgtgtgttattctgactccatgtaatctgctaatcccaccttcttcagtcgagctttattatat
tcgcgtaccggagacccaggcagaggtgaggacgaatatgttgcaggagtaaagaagc
tattgaaggatttcttaggacgcgctgctggtgttctaaagtagtatagaagctaagtcaag
ccggagcatactccgatatttggagcctgataccagttactgggtgtttagcagaagcgtt
acgtgacttacacgatataatgactatacttgatctgaaggcatcaagtatcaacgaaagtc
ctttctgattgacaaacagactctcactttacagggataggattggaaccaccaatctgagg
tattcaccagtatccagccactgctctctcaagtccaacgtaatccaaggagactccggca
attccttaattggcgttagctactgtgttgcgagcatttattactatctggcaaggagtgacaa
attagcaggattgattgaggtttgtgatccaccagaaggaaggactcaccgttaggtatgg
tgaagatacccagcttgtgctgactgaggatagcaagacagatcacttatcactcgaaca
gatcggacccaccgcacacctcaatatctctttaggaccaattcaagaacaacttagacgc
tgtacacttaaacagcacagctgtgggtaagagaagtaatagagcgcgatatcagcagc
agcctcttgtagatcggcttcaagatatctatgtgtggaaataggtcactagagtgagcggt
actttcgctcttacaggtttgaaaggtcttagcagcgctatttagcgagtcctggagaccac
gacaacgagcgctgtggtcctcacaaataggaccaacaataacaatacaggatttatcaa
gagatagaagtcggtataccgattctgctgtttcgtagtcggctacagatcaatagattattg
tgttcagattagttgaggaagttgaatgggtcaaggaccttacctaataccaggtcaccgg
acttggtaattttccctcttggggttggtgagtagtactgtctaccaactggtgactggtgatc
ccttacttgtttggaccctggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaa
gaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgct
ggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtca
gaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccc
tcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgg
gaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgc
tccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggt
aactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccact
ggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtgg
cctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttac
cttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtgg
ttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgat
cttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatga
gattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttcacgtagaaacccagtccgcagaaacg
gtgctgacccctgatgaatgtcacctactgggttatctggacaagggaaaacccaagcgc
aaagagaaagcaggtagcttggagtggggttacatggtgataggtagactgggaggtttt
atggacaggaaccgaacctcaattcccaggtggggtgtcctctggtaaggttgggaagtc
ctggaaagtaaactggatggctttctcgccgctgttacattgcacaagataaaaatatatca
tcatgaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatatt
caacgggaaacgtcgaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtata

		aatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgcttgtatgggaagc ccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgttacaga tgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcattttat ccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccggaaaaacagcattccag gtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtgttcctgcgc cggttgcattcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgtatttcgtctcgctca ggcgcaatcacgaatgaataacggtttggttgatgcgagtgattttgatgacgagcgtaat ggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaacttttgccattctcaccggattc agtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaataggt tgtattgatgttggacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgccatcctatgga actgcctcggtgagttttctccttcattacagaaacggctttttcaaaaatatggtattgataat cctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgctcgatgagtttttctaaatttgttaaaatttttt gttaaatcagctcatttttaaccaataggccctgttggttcaagtctccctaatagtttgagg ggaaggagttggtgtcaagggtctgaccaccatattacgggactagagacaggtggagg tctggacaccctattggtggatcattcattatggatacggtcctggacaagtggactgatcc caattaggagactggtccagtgtcccaccttgagaggtactgatactcacttacctcaaac actaggttcttaagagggtgatggagagagattaggaccaaaccagagactttggtccta actccagaggtagtgagtacaaaacaccactaggtgaggttgggaccagtctattttctcc aaactgagaaggtgtcagtggaggcacacttaccctctcactggctattcgccattcaggc tgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcggg	
[0219]	34	MVILQQGDHVWMDLRLGQEFDVPIGAVVKLCDSGQVQV VDDEDNEHWISPQNATHIKPMHPTSVHGVEDMIRLGDLN EAGILRNLLIRYRDHLIYTYTGSILVAVNPYQLLSIYSPEHI RQYTNKKIGEMPPHIFAIADNCYFNMKRNSRDQCCIISGE SGAGKTESTKLILQFLAAISGQHSWIEQQVLEATPILEAFG NAKTIRNDNSSRFGKYIDIHFNKRGAIEGAKIEQYLLEKSR VCRQALDERNYHVFYCMLEGMSEDQKKKLGLGQASDY NYLAMGNCITCEGRVDSQEYANIRSAMKVLMFTDTENW EISKLLAAILHLGNLQYEARTFENLDACEVLFSPSLATAAS LLEVNPPDLMSCLTSRTLITRGETVSTPLSREQALDVRDA FVKGIYGRLFVWIVDKINAAIYKPPSQDVKNSRRSIGLLDI FGFENFAVNSFEQLCINFANEHLQQFFVRHVFKLEQEEYD LESIDWLHIEFTDNQDALDMIANKPMNIISLIDEESKFPKG TDTTMLHKLNSQHKLNANYIPPKNNHETQFGINHFAGIV YYETQGFLEKNRDTLHGDIIQLVHSSRNKFIKQIFQADVA MGAETRKRSPTLSSQFKRSLELLMRTLGACQPFFVRCIKP NEFKKPMLFDRHLCVRQLRYSGMMETIRIRRAGYPIRYSF VEFVERYRVLLPGVKPAYKQGDLRGTCQRMAEAVLGTH DDWQIGKTKIFLKDHHDMLLEVERDKAITDRVILLQKVIR GFKDRSNFLKLKNAATLIQRHWRGHNCRKNYGLMRLGF LRLQALHRSRKLHQQYRLARQRIIQFQARCRAYLVRKAF	人 Myo 7a - Gen Ban k: EA W75 022. 1

[0220]

	RHRLWAVLTVQAYARGMIARRLHQRLRAEYLWRLEAEK MRLAEEEKLRKEMSAKKAKEEAERKHQERLAQLAREDA ERELKEKEAARRKKELLEQMERARHEPVNHSDMVDKMF GFLGTSGGLPGQEGQAPSGFEDLERGRREMVEEDLDAAL PLPDEDEEDLSEYKFAKFAATYFQGTTTHSYTRRPLKQPL LYHDDEGDQLAALAVWITILRFMGDLPEPKYHTAMSDGS EKIPVMTKIYETLGKKTYKRELQALQGEGEAQLPEGQKK SSVRHKLVHLTLKKKSKLTEEVTKRLHDGESTVQGNSML EDRPTSNLEKLHFIIGNGILRPALRDEIYCQISKQLTHNPSK SSYARGWILVSLCVGCFAPSEKFVKYLRNFIHGGPPGYAP YCEERLRRTFVNGTRTQPPSWLELQATKSKKPIMLPVTF MDGTTKTLLTDSATTAKELCNALADKISLKDRFGFSLYIA LFDKVSSLGSGSDHVMDAISQCEQYAKEQGAQERNAPW RLFFRKEVFTPWHSPSEDNVATNLIYQQVVRGVKFGEYR CEKEDDLAELASQQYFVDYGSEMILERLLNLVPTYIPDRE ITPLKTLEKWAQLAIAAHKKGIYAQRRTDAQKVKEDVVS YARFKWPLLFSRFYEAYKFSGPSLPKNDVIVAVNWTGVY FVDEQEQVLLELSFPEIMAVSSSRGAKTTAPSFTLATIKGD EYTFTSSNAEDIRDLVVTFLEGLRKRSKYVVALQDNPNPA GEESGFLSFAKGDLIILDHDTGEQVMNSGWANGINERTK QRGDFPTDCVYVMPTVTMPPREIVALVTMTPDQRQDVV RLLQLRTAEPEVRAKPYTLEEFSYDYFRPPPKHTLSRVMV SKARGKDRLWSHTREPLKQALLKKLLGSEELSQEACLAFI DIPVLKYMGDYPSKRTRSVNELTDQIFEGPLKAEPLKDEA YVQILKQLTDNHIRYSEERGWELLWLCTGLFPPSNILLPH VQRFLQSRKHCPLAIDCLQRLQKALRNGSRKYPPHLVEV EAIQHKTTQIFHKVYFPDDTDEAFEVESSTKAKDFCQNIA TRLLLKSSEGFSLFVKIADKVISVPENDFFFDFVRHLTDWI KKARPIKDGIVPSLTYQVFFMKKLWTTTVPGKDPMADSIF HYYQELPKYLRGYHKCTREEVLQLGALIYRVKFEEDKSY FPSIPKLLRELVPQDLIRQVSPDDWKRSIVAYFNKHAGKS KEEAKLAFLKLIFKWPTFGSAFFEQTTEPNFPEILLIAINKY GVSLIDPKTKDILTTHPFTKISNWSSGNTYFHITIGNLVRG SKLLCETSLGYKMDDLLTSYISQMLTAMSKQRGSRSGK	
35	MVILQQGDHVWMDLRLGQEFDVPIGAVVKLCDSGQVQV VDDEDNEHWISPQNATHIKPMHPTSVHGVEDMIRLGDLN EAGILRNLLIRYRDHLIYTYTGSILVAVNPYQLLSIYSPEHI RQYTNKKIGEMPPHIFAIADNCYFNMKRNSRDQCCIISGE SGAGKTESTKLILQFLAAISGQHSWIEQQVLEATPILEAFG NAKTIRNDNSSRFGKYIDIHFNKRGAIEGAKIEQYLLEKSR VCRQALDERNYHVFYCMLEGMSEDQKKKLGLGQASDY	人 AB CA4 – NC BI

[0221]	NYLAMGNCITCEGRVDSQEYANIRSAMKVLMFTDTENW EISKLLAAILHLGNLQYEARTFENLDACEVLFSPSLATAAS LLEVNPPDLMSCLTSRTLITRGETVSTPLSREQALDVRDA FVKGIYGRLFVWIVDKINAAIYKPPSQDVKNSRRSIGLLDI FGFENFAVNSFEQLCINFANEHLQQFFVRHVFKLEQEEYD LESIDWLHIEFTDNQDALDMIANKPMNIISLIDEESKFPKG TDTTMLHKLNSQHKLNANYIPPKNNHETQFGINHFAGIV YYETQGFLEKNRDTLHGDIIQLVHSSRNKFIKQIFQADVA MGAETRKRSPTLSSQFKRSLELLMRTLGACQPFFVRCIKP NEFKKPMLFDRHLCVRQLRYSGMMETIRIRRAGYPIRYSF VEFVERYRVLLPGVKPAYKQGDLRGTCQRMAEAVLGTH DDWQIGKTKIFLKDHHDMLLEVERDKAITDRVILLQKVIR GFKDRSNFLKLKNAATLIQRHWRGHNCRKNYGLMRLGF LRLQALHRSRKLHQQYRLARQRIIQFQARCRAYLVRKAF RHRLWAVLTVQAYARGMIARRLHQRLRAEYLWRLEAEK MRLAEEEKLRKEMSAKKAKEEAERKHQERLAQLAREDA ERELKEKEAARRKKELLEQMERARHEPVNHSDMVDKMF GFLGTSGGLPGQEGQAPSGFEDLERGRREMVEEDLDAAL PLPDEDEEDLSEYKFAKFAATYFQGTTTHSYTRRPLKQPL LYHDDEGDQLAALAVWITILRFMGDLPEPKYHTAMSDGS EKIPVMTKIYETLGKKTYKRELQALQGEGEAQLPEGQKK SSVRHKLVHLTLKKKSKLTEEVTKRLHDGESTVQGNSML EDRPTSNLEKLHFIIGNGILRPALRDEIYCQISKQLTHNPSK SSYARGWILVSLCVGCFAPSEKFVKYLRNFIHGGPPGYAP YCEERLRRTFVNGTRTQPPSWLELQATKSKKPIMLPVTF MDGTTKTLLTDSATTAKELCNALADKISLKDRFGFSLYIA LFDKVSSLGSGSDHVMDAISQCEQYAKEQGAQERNAPW RLFFRKEVFTPWHSPSEDNVATNLIYQQVVRGVKFGEYR CEKEDDLAELASQQYFVDYGSEMILERLLNLVPTYIPDRE ITPLKTLEKWAQLAIAAHKKGIYAQRRTDAQKVKEDVVS YARFKWPLLFSRFYEAYKFSGPSLPKNDVIVAVNWTGVY FVDEQEQVLLELSFPEIMAVSSSRECRVWLSLGCSDLGCA APHSGWAGLTPAGPCSPCWSCRGAKTTAPSFTLATIKGD EYTFTSSNAEDIRDLVVTFLEGLRKRSKYVVALQDNPNPA GEESGFLSFAKGDLIILDHDTGEQVMNSGWANGINERTK QRGDFPTDSVYVMPTVTMPPREIVALVTMTPDQRQDVV RLLQLRTAEPEVRAKPYTLEEFSYDYFRPPPKHTLSRVMV SKARGKDRLWSHTREPLKQALLKKLLGSEELSQEACLAFI AVLKYMGDYPSKRTRSVNELTDQIFEGPLKAEPLKDEAY VQILKQLTDNHIRYSEERGWELLWLCTGLFPPSNILLPHV QRFLQSRKHCPLAIDCLQRLQKALRNGSRKYPPHLVEVE	参考序列：NP_000251.3

		AIQHKTTQIFHKVYFPDDTDEAFEVESSTKAKDFCQNIAT RLLLKSSEGFSLFVKIADKVLSVPENDFFFDFVRHLTDWI KKARPIKDGIVPSLTYQVFFMKKLWTTTVPGKDPMADSIF HYYQELPKYLRGYHKCTREEVLQLGALIYRVKFEEDKSY FPSIPKLLRELVPQDLIRQVSPDDWKRSIVAYFNKHAGKS KEEAKLAFLKLIFKWPTFGSAFFEVKQTTEPNFPEILLIAIN KYGVSLIDPKTKDILTTHPFTKISNWSSGNTYFHITIGNLV RGSKLLCETSLGYKMDDLLTSYISQMLTAMSKQRGSRSG K	
[0222]	36	MTDKSIVILSLMVFHSSFINGKTCRRQLVEEWHPQPSSYV VNWTLTENICLDFYRDCWFLGVNTKIDTSGNQAVPQICP LQIQLGDILVISSEPSLQFPEINLMNVSETSFVGCVQNTTTE DQLLFGCRLKGMHTVNSKWLSVGTHYFITVMASGPSPCP LGLRLNVTVKQQFCQESLSSEFCSGHGKCLSEAWSKTYS CHCQPPFSGKYCQELDACSFKPCKNNGSCINKRENWDEQ AYECVCHPPFTGKNCSEIIGQCQPHVCFHGNCSNITSNSFI CECDEQFSGPFCEVSAKPCVSLLFWKRGICPNSSSAYTYE CPKGSSSQNGETDVSEFSLVPCQNGTDCIKISNDVMCICSP IFTDLLCKSIQTSCESFPLRNNATCKKCEKDYPCSCISGFTE KNCEKAIDHCKLLSINCLNEEWCFNIIGRFKYVCIPGCTKN PCWFLKNVYLIHQHLCYCGVTFHGICQDKGPAQFEYVW QLGFAGSEGEKCQGVIDAYFFLAANCTEDATYVNDPEDN NSSCWFPHEGTKEICANGCSCLSEEDSQEYRYLCFLRWA GNMYLENTTDDQENECQHEAVCKDEINRPRCSCSLSYIG RLCVVNVDYCLGNHSISVHGLCLALSHNCNCSGLQRYER NICEIDTEDCKSASCKNGTTSTHLRGYFFRKCVPGFKGTQ CEIDIDECASHPCKNGATCIDQPGNYFCQCVPPFKVVDGF SCLCNPGYVGIRCEQDIDDCILNACEHNSTCKDLHLSYQC VCLSDWEGNFCEQESNECKMNPCKNNSTCTDLYKSYRC ECTSGWTGQNCSEEINECDSDPCMNGGLCHESTIPGQFVC LCPPLYTGQFCHQRYNLCDLLHNPCRNNSTCLALVDANQ HCICREEFEGKNCEIDVKDCLFLSCQDYGDCEDMVNNFR CICRPGFSGSLCEIEINECSSEPCKNNGTCVDLTNRFFCNC EPEYHGPFCELDVNKCKISPCLDEENCVYRTDGYNCLCA PGYTGINCEINLDECLSEPCLHDGVCIDGINHYTCDCKSGF FGTHCETNANDCLSNPCLHGRCTELINEYPCSCDADGTST QCKIKINDCTSIPCMNEGFCQKSAHGFTCICPRGYTGAYC EKSIDNCAEPELNSVICLNGGICVDGPGHTFDCRCLPGFSG QFCEININECSSSPCLHGADCEDHINGYVCKCQPGWSGHH CENELECIPNSCVHELCMENEPGSTCLCTPGFMTCSIGLLC	人EYS-NCBI参考序列：NM_001142800.2

[0223]

GDEIRRITCLTPIFQRTDPISTQTYTIPPSETLVSSFPSIKATR
IPAIMDTYPVDQGPKQTGIVKHDILPTTGLATLRISTPLES
YLLQELIVTRELSAKHSLLSSADVSSSRFLNFGIRDPAQIV
QDKTSVSHMPIRTSAATLGFFFPDRRARTPFIMSSLMSDFI
FPTQSLLFENCQTVALSATPTTSVIRSIPGADIELNRQSLLS
RGFLLIAASISATPVVSRGAQEDIEEYSADSLISRREHWRL
LSPSMSPIFPAKVIISKQVTILNSSALHRFSTKAFNPSEYQA
ITEASSNQRLTNIKSQAADSLRELSQTCATCSMTEIKSSRE
FSDQVLHSKQSHFYETFWMNSAILASWYALMGAQTITSG
HSFSSATEITPSVAFTEVPSLFPSKKSAKRTILSSSLEESITL
SSNLDVNLCLDKTCLSIVPSQTISSDLMNSDLTSKMTTDE
LSVSENILKLLKIRQYGITMGPTEVLNQESLLDMEKSKGS
HTLFKLHPSDSSLDFELNLQIYPDVTLKTYSEITHANDFKN
NLPPLTGSVPDFSEVTTNVAFYTVSATPALSIQTSSSMSVI
RPDWPYFTDYMTSLKKEVKTSSEWSKWELQPSVQYQEF
PTASRHLPFTRSLTLSSLESILAPQRLMISDFSCVRYYGDS
YLEFQNVALNPQNNISLEFQTFSSYGLLLYVKQDSNLVDG
FFIQLFIENGTLKYHFYCPGEAKFKSINTTVRVDNGQKYT
LLIRQELDPCNAELTILGRNTQICESINHVLGKPLPKSGSV
FIGGFPDLHGKIQMPVPVKNFTGCIEVIEINNWRSFIPSKA
VKNYHINNCRSQGFMLSPTASFVDASDVTQGVDTMWTS
VSPSVAAPSVCQQDVCHNGGTCHAIFLSSGIVSFQCDCPL
HFTGRFCEKDAGLFFPSFNGNSYLELPFLKFVLEKEHNRT
VTIYLTIKTNSLNGTILYSNGNNCGKQFLHLFLVEGRPSV
KYGCGNSQNILTVSANYSINTNAFTPITIRYTTPVGSPGVV
CMIEMTADGKPPVQKKDTEISHASQAYFESMFLGHIPAN
VQIHKKAGPVYGFRGCILDLQVNNKEFFIIDEARHGKNIE
NCHVPWCAHHLCRNNGTCISDNENLFCECPRLYSGKLCQ
FASCENNPCGNGATCVPKSGTDIVCLCPYGRSGPLCTDAI
NITQPRFSGTDAFGYTSFLAYSRISDISFHYEFHLKFQLAN
NHSALQNNLIFFTGQKGHGLNGDDFLAVGLLNGSVVYSY
NLGSGIASIRSEPLNLSLGVHTVHLGKFFQEGWLKVDDH
KNKSIIAPGRLVGLNVFSQFYVGGYSEYTPDLLPNGADFK
NGFQGCIFTLQVRTEKDGHFRGLGNPEGHPNAGRSVGQC
HASPCSLMKCGNGGTCIESGTSVYCNCTTGWKGSFCTET
VSTCDPEHDPPHHCSRGATCISLPHGYTCFCPLGTTGIYCE
QALSISDPSFRSNELSWMSFASFHVRKKTHIQLQFQPLAA
DGILFYAAQHLKAQSGDFLCISLVNSSVQLRYNLGDRTIIL
ETLQKVTINGSTWHIIKAGRVGAEGYLDLDGINVTEKAST
KMSSLDTNTDFYIGGVSSLNLVNPMAIENEPVGFQGCIRQ
VIINNQELQLTEFGAKGGSNVGDCDGTACGYNTCRNGGE

		CTVNGTTFSCRCLPDWAGNTCNQSVSCLNNLCLHQSLCI PDQSFSYSCLCTLGWVGRYCENKTSFSTAKFMGNSYIKYI DPNYRMRNLQFTTISLNFSTTKTEGLIVWMGIAQNEENDF LAIGLHNQTLKIAVNLGERISVPMSYNNGTFCCNKWHHV VVIQNQTLIKAYINNSLILSEDIDPHKNFVALNYDGICYLG GFEYGRKVNIVTQEIFKTNFVGKIKDVVFFQEPKNIELIKL EGYNVYDGDEQNEVT	
	37	MWTLGRRAVAGLLASPSPAQAQTLTRVPRPAELAPLCGR RGLRTDIDATCTPRRASSNQRGLNQIWNVKKQSVYLMNL RKSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPY TFEDYDVSFGSGVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLS SPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALK TKLDLSSLAYSGKDA	人FXN-NCBI参考序列：NP_000135.2
[0224]	38	MSRKIEGFLLLLLFGYEATLGLSSTEDEGEDPWYQKACK CDCQGGPNALWSAGATSLDCIPECPYHKPLGFESGEVTP DQITCSNPEQYVGWYSSWTANKARLNSQGFGCAWLSKF QDSSQWLQIDLKEIKVISGILTQGRCDIDEWMTKYSVQYR TDERLNWIYYKDQTGNNRVFYGNSDRTSTVQNLLRPPIIS RFIRLIPLGWHVRIAIRMELLECVSKCA	人RS1–GenbankAF014459.1
	39	MFKSLTKVNKVKPIGENNENEQSSRRNEEGSHPSNQSQQ TTAQEENKGEEKSLKTKSTPVTSEEPHTNIQDKLSKKNSS GDLTTNPDPQNAAEPTGTVPEQKEMDPGKEGPNSPQNKP PAAPVINEYADAQLHNLVKRMRQRTALYKKKLVEGDLS SPEASPQTAKPTAVPPVKESDDKPTEHYYRLLWFKVKKM PLTEYLKRIKLPNSIDSYTDRLYLLWLLLVTLAYNWNCCF IPLRLVFPYQTADNIHYWLIADIICDIIYLYDMLFIQPRLQF VRGGDIIVDSNELRKHYRTSTKFQLDVASIIPFDICYLFFGF NPMFRANRMLKYTSFFEFNHHLESIMDKAYIYRVIRTTGY LLFILHINACVYYWASNYEGIGTTRWVYDGEGNEYLRCY YWAVRTLITIGGLPEPQTLFEIVFQLLNFFSGVFVFSSLIGQ MRDVIGAATANQNYFRACMDDTIAYMNNYSIPKLVQKR VRTWYEYTWDSQRMLDESDLLKTLPTTVQLALAIDVNFS	人CNGB3-NCBI参考序列：NM_001909

[0225]

	IISKVDLFKGCDTQMIYDMLLRLKSVLYLPGDFVCKKGEI GKEMYIIKHGEVQVLGGPDGTKVLVTLKAGSVFGEISLL AAGGGNRRTANVVAHGFANLLTLDKKTLQEILVHYPDSE RILMKKARVLLKQKAKTAEATPPRKDLALLFPPKEETPKL FKTLLGGTGKASLARLLKLKREQAAQKKENSEGGEEEGK ENEDKQKENEDKQKENEDKGKENEDKDKGREPEEKPLD RPECTASPIAVEEEPHSVRRTVLPRGTSRQSLIISMAPSAE GGEEVLTIEVKEKAKQ	8.5
40	MAKINTQYSHPSRTHLKVKTSDRDLNRAENGLSRAHSSS EETSSVLQPGIAMETRGLADSGQGSFTGQGIARLSRLIFLL RRWAARHVHHQDQGPDSFPDRFRGAELKEVSSQESNAQ ANVGSQEPADRGRSAWPLAKCNTNTSNNTEEEKKTKKK DAIVVDPSSNLYYRWLTAIALPVFYNWYLLICRACFDELQ SEYLMLWLVLDYSADVLYVLDVLVRARTGFLEQGLMVS DTNRLWQHYKTTTQFKLDVLSLVPTDLAYLKVGTNYPE VRFNRLLKFSRLFEFFDRTETRTNYPNMFRIGNLVLYILIII HWNACIYFAISKFIGFGTDSWVYPNISIPEHGRLSRKYIYS LYWSTLTLTTIGETPPPVKDEEYLFVVVDFLVGVLIFATIV GNVGSMISNMNASRAEFQAKIDSIKQYMQFRKVTKDLET RVIRWFDYLWANKKTVDEKEVLKSLPDKLKAEIAINVHL DTLKKVRIFQDCEAGLLVELVLKLRPTVFSPGDYICKKGD IGKEMYIINEGKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNI KGSKSGNRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLMEALTEYPEAK KALEEKGRQILMKDNLIDEELARAGADPKDLEEKVEQLG SSLDTLQTRFARLLAEYNATQMKMKQRLSQLESQVKGG GDKPLADGEVPGDATKTEDKQQ	人CNGA3-NCBI参考序列：NM_001298.3
41	MAQQWSLQRLAGRHPQDSYEDSTQSSIFTYTNSNSTRGP FEGPNYHIAPRWVYHLTSVWMIFVVIASVFTNGLVLAAT MKFKKLRHPLNWILVNLAVADLAETVIASTISVVNQVYG YFVLGHPMCVLEGYTVSLCGITGLWSLAIISWERWMVVC KPFGNVRFDAKLAIVGIAFSWIWAAVWTAPPIFGWSRYW PHGLKTSCGPDVFSGSSYPGVQSYMIVLMVTCCITPLSIV LCYLQVWLAIRAVAKQQKESESTQKAEKEVTRMVVVMV LAFCFCWGPYAFFACFAAANPGYPFHPLMAALPAFFAKS ATIYNPVIYVFMNRQFRNCILQLFGKKVDDGSELSSASKT EVSSVSSVSPA	人OPN1MW-NCBI参考序列：NM_000513.2

[0226]

42	MAQQWSLQRLAGRHPQDSYEDSTQSSIFTYTNSNSTRGP FEGPNYHIAPRWVYHLTSVWMIFVVTASVFTNGLVLAAT MKFKKLRHPLNWILVNLAVADLAETVIASTISIVNQVSGY FVLGHPMCVLEGYTVSLCGITGLWSLAIISWERWMVVCK PFGNVRFDAKLAIVGIAFSWIWAAVWTAPPIFGWSRYWP HGLKTSCGPDVFSGSSYPGVQSYMIVLMVTCCIIPLAIIML CYLQVWLAIRAVAKQQKESESTQKAEKEVTRMVVVMIF AYCVCWGPYTFFACFAAANPGYAFHPLMAALPAYFAKS ATIYNPVIYVFMNRQFRNCILQLFGKKVDDGSELSSASKT EVSSVSSVSPA	人 OPN1LW - NCBI 参考序列：NM_002006 1.6
43	MREPEELMPDSGAVFTFGKSKFAENNPGKFWFKNDVPV HLSCGDEHSAVVTGNNKLYMFGSNNWGQLGLGSKSAIS KPTCVKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTEGGNVYATGGN NEGQLGLGDTEERNTFHVISFFTSEHKIKQLSAGSNTSAA LTEDGRLFMWGDNSEGQIGLKNVSNVCVPQQVTIGKPVS WISCGYYHSAFVTTDGELYVFGEPENGKLGLPNQLLGNH RTPQLVSEIPEKVIQVACGGEHTVVLTENAVYTFGLGQFG QLGLGTFLFETSEPKVIENIRDQTISYISCGENHTALITDIG LMYTFGDGRHGKLGLGLENFTNHFIPTLCSNFLRFIVKLV ACGGCHMVVFAAPHRGVAKEIEFDEINDTCLSVATFLPY SSLTSGNVLQRTLSARMRRRERERSPDSFSMRRTLPPIEGT LGLSACFLPNSVFPRCSERNLQESVLSEQDLMQPEEPDYL LDEMTKEAEIDNSSTVESLGETTDILNMTHIMSLNSNEKS LKLSPVQKQKKQQTIGELTQDTALTENDDSDEYEEMSEM KEGKACKQHVSQGIFMTQPATTIEAFSDEEVEIPEEKEGA EDSKGNGIEEQEVEANEENVKVHGGRKEKTEILSDDLTD KAEDHEFSKTEELKLEDVDEEINAENVESKKKTVGDDES VPTGYHSKTEGAERTNDDSSAETIEKKEKANLEERAICEY NENPKGYMLDDADSSSLEILENSETTPSKDMKKTKKIFLF KRVPSINQKIVKNNNEPLPEIKSIGDQIILKSDNKDADQNH MSQNHQNIPPTNTERRSKSCTIL	人 RPGR - NCBI 参考序列：NM_000328.3
44	MREPEELMPDSGAVFTFGKSKFAENNPGKFWFKNDVPV HLSCGDEHSAVVTGNNKLYMFGSNNWGQLGLGSKSAIS KPTCVKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTEGGNVYATGGN NEGQLGLGDTEERNTFHVISFFTSEHKIKQLSAGSNTSAA LTEDGRLFMWGDNSEGQIGLKNVSNVCVPQQVTIGKPVS	人 RPGR-ORF15 -

[0227]

	WISCGYYHSAFVTTDGELYVFGEPENGKLGLPNQLLGNH RTPQLVSEIPEKVIQVACGGEHTVVLTENAVYTFGLGQFG QLGLGTFLFETSEPKVIENIRDQTISYISCGENHTALITDIG LMYTFGDGRHGKLGLGLENFTNHFIPTLCSNFLRFIVKLV ACGGCHMVVFAAPHRGVAKEIEFDEINDTCLSVATFLPY SSLTSGNVLQRTLSARMRRRERERSPDSFSMRRTLPPIEGT LGLSACFLPNSVFPRCSERNLQESVLSEQDLMQPEEPDYL LDEMTKEAEIDNSSTVESLGETTDILNMTHIMSLNSNEKS LKLSPVQKQKKQQTIGELTQDTALTENDDSDEYEEMSEM KEGKACKQHVSQGIFMTQPATTIEAFSDEEVEIPEEKEGA EDSKGNGIEEQEVEANEENVKVHGGRKEKTEILSDDLTD KAEVSEGKAKSVGEAEDGPEGRGDGTCEEGSSGAEHWQ DEEREKGEKDKGRGEMERPGEGEKELAEKEEWKKRDGE EQEQKEREQGHQKERNQEMEEGGEEEHGEGEEEEGDRE EEEEKEGEGKEEGEGEEVEGEREKEEGERKKEERAGKEE KGEEEGDQGEGEEEETEGRGEEKEEGGEVEGGEVEEGKG EREEEEEEGEGEEEEGEGEEEEGEGEEEEGEGKGEEEGEE GEGEEEGEEGEGEGEEEEGEGEGEEEGEGEGEEEEGEGE GEEEGEGEGEEEEGEGKGEEEGEEGEGEGEEEEGEGEGE DGEGEGEEEEGEWEGEEEEGEGEGEEEGEGEGEEGEGEG EEEEGEGEGEEEEGEEEGEEEGEGEEEGEGEGEEEEEGEV EGEVEGEEGEGEGEEEEGEEEGEEREKEGEGEENRRNRE EEEEEEGKYQETGEEENERQDGEEYKKVSKIKGSVKYGK HKTYQKKSVTNTQGNGKEQRSKMPVQSKRLLKNGPSGS KKFWNNVLPHYLELK	NCBI参考序列：NP_001030025.1
45	gggggggggggggggggttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgagg ccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcg agcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcctcagatctgaat tcggtacctagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagt tccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgc ccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacg tcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgc caagtacgcccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagt acatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccat ggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccccccccctccccaccccca attttgtatttatttatttttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggggg cgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcggag aggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggc ggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcg cgctgccttcgccccgtgccccgctccgccgccgcctcgcgccgcccgccccggctct gactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgt	转移质粒_pTR-UF11

[0228]

aattagcgcttggtttaatgacggcttgtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttgagggg
ctccgggagggccctttgtgcgggggagcggctcgggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgt
gcgtggggagcgccgcgtgcggctccgcgctgcccggcggctgtgagcgctgcgggc
gcggcgcggggctttgtgcgctccgcagtgtgcgcgaggggagcgcggccgggggc
ggtgccccgcggtgcgggggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgt
gtgcgtgggggggtgagcaggggggtgtgggcgcgtcggtcgggctgcaacccccccct
gcacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctccgtacg
gggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtggcggcaggtgggggtgc
cgggcggggcggggccgcctcgggccggggagggctcgggggagggggcgcggcg
gcccccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgccttttatg
gtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctgtgcggagccgaaatc
tgggaggcgccgccgcaccccctctagcgggcgcggggcgaagcggtgcggcgccg
gcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccttct
ccctctccagcctcggggctgtccgcgggggggacggctgccttcgggggggacgggg
cagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaaccatgt
tcatgccttcttcttttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattt
tggcaaagaattcctcgaagatctaggcctgcaggcggccgccgccaccatgagcaag
ggcgaggaactgttcactggcgtggtcccaattctcgtggaactggatggcgatgtgaat
gggcacaaattttctgtcagcggagagggtgaaggtgatgccacatacggaaagctcac
cctgaaattcatctgcaccactggaaagctccctgtgccatggccaacactggtcactacc
ctgacctatggcgtgcagtgcttttccagatacccagaccatatgaagcagcatgacttttt
caagagcgccatgcccgagggctatgtgcaggagagaaccatcttttcaaagatgacg
ggaactacaagacccgcgctgaagtcaagttcgaaggtgacaccctggtgaatagaatc
gagctgaagggcattgactttaaggaggatggaaacattctcggccacaagctggaatac
aactataactcccacaatgtgtacatcatggccgacaagcaaaagaatggcatcaaggtc
aacttcaagatcagacacaacattgaggatggatccgtgcagctggccgaccattatcaa
cagaacactccaatcggcgacggccctgtgctcctcccagacaaccattacctgtccacc
cagtctgccctgtctaaagatcccaacgaaaagagagaccacatggtcctgctggagttt
gtgaccgctgctgggatcacacatggcatggacgagctgtacaagtgagcggccgcgc
ggatccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtg
aaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaa
taaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggggaggtgtgggg
aggttttttagtcgacctcgagcagtgtggttttgcaagaggaagcaaaaagcctctccac
ccaggcctggaatgtttccacccaagtcgaaggcagtgtggttttgcaagaggaagcaaa
aagcctctccacccaggcctggaatgtttccacccaatgtcgagcaaccccgcccagcgt
cttgtcattggcgaattcgaacacgcagatgcagtcggggcggcgcggtcccaggtcca
cttcgcatattaaggtgacgcgtgtggcctcgaacaccgagcgaccctgcagccaatatg
ggatcggccattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagag
gctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccg
gctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaat
gaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcg

[0229]

cagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtg
ccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctg
atgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcga
aacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatc
tggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgc
gcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatca
tggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggacc
gctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatggg
ctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctat
cgccttcttgacgagttcttctgaggggatccgtcgactagagctcgctgatcagcctcga
ctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctgg
aaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagt
aggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattggg
aagacaatagcaggcatgctggggagagatctgaggaaccccctagtgatggagttggc
cactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtc
gggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtgg
ccaaccccccccccccccccctgcagccctgcattaatgaatcggccaacgcgcgggg
gagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcg
gtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccaca
gaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagg
aaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcat
cacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccc
aggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccgg
atacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggt
atctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttca
gcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacga
cttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcg
gtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttgg
tatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggca
aacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaa
aaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaa
aactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaa
attaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttacca
atgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctga
ctccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgca
atgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagc
cggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaat
tgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccat
tgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttccca
acgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggt
cctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcact

[0230]

	gcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaacc aagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacggg ataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggg gcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgca cccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaag gcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactctt cctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatg tatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgac gtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggcccttt cgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacg gtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcag cgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactga gagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatc aggaaattgtaaacgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcatttttt taaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagg gttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtca aagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcaccctaatca agtttttttggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagcccccga tttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcg aaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccacc acacccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtcgcgccattcgccattcaggct acgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccaggctgca	
46	aattcccatcatcaataatataccttattttggattgaagccaatatgataatgaggggtgg agtttgtgacgtggcgcggggcgtgggaacggggcgggtgacgtagtagtctctagagt cctgtattagaggtcacgtgagtgttttgcgacattttgcgacaccatgtggtcacgctggg tatttaagcccgagtgagcacgcagggtctccattttgaagcgggaggtttgaacgcgca gccaccacggcggggttttacgagattgtgattaaggtccccagcgaccttgacgggcat ctgcccggcatttctgacagctttgtgaactgggtggccgagaaggaatgggagttgccg ccagattctgacatggatctgaatctgattgagcaggcacccctgaccgtggccgagaag ctgcagcgcgactttctgacggaatggcgccgtgtgagtaaggccccggaggccctttc tttgtgcaatttgagaagggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaaccacc ggggtgaaatccatggttttgggacgtttcctgagtcagattcgcgaaaaactgattcaga gaatttaccgcgggatcgagccgactttgccaaactggttcgcggtcacaaagaccaga aatggcgccggaggcgggaacaaggtggtggatgagtgctacatccccaattacttgct ccccaaaacccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagtatttaagcgc ctgtttgaatctcacggagcgtaaacggttggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgca gacgcaggagcagaacaaagagaatcagaatcccaattctgatgcgccggtgatcagat caaaaacttcagccaggtacatggagctggtcgggtggctcgtggacaaggggattacc tcggagaagcagtggatccaggaggaccaggcctcatacatctccttcaatgcggcctc caactcgcggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgcgggaaagattatgagcctga ctaaaaccgccccgactacctggtgggccagcagcccgtggaggacatttccagcaat	Rep/Cap质粒–pACG2

[0231]

cggatttataaaattttggaactaaacgggtacgatccccaatatgcggcttccgtctttctg
ggatgggccacgaaaaagttcggcaagaggaacaccatctggctgtttgggcctgcaac
taccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgcccttctacgggtgcg
taaactggaccaatgagaactttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtg
ggaggaggggaagatgaccgccaaggtcgtggagtcggccaaagccattctcggagg
aagcaaggtgcgcgtggaccagaaatgcaagtcctcggcccagatagacccgactccc
gtgatcgtcacctccaacaccaacatgtgcgccgtgattgacgggaactcaacgaccttc
gaacaccagcagccgttgcaagaccggatgttcaaatttgaactcacccgccgtctggat
catgactttgggaaggtcaccaagcaggaagtcaaagacttttccggtgggcaaaggat
cacgtggttgaggtggagcatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagacc
cgcccccagtgacgcagatataagtgagcccaaacgggtgcgcgagtcagttgcgcag
ccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggtaccaaaacaaatg
ttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgtttccctgcagacaatgcgagagaatgaatc
agaattcaaatatctgcttcactcacggacagaaagactgtttagagtgctttcccgtgtca
gaatctcaacccgtttctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatcatatc
atgggaaaggtgccagacgcttgcactgcctgcgatctggtcaatgtggatttggatgact
gcatctttgaacaataaatgatttaaatcaggtatggctgccgatggttatcttccagattgg
ctcgaggacactctctctgaaggaataagacagtggtggaagctcaaacctggcccacc
accaccaaagcccgcagagcggcataaggacgacagcaggggtcttgtgcttcctggg
tacaagtacctcggacccttcaacggactcgacaagggagagccggtcaacgaggcag
acgccgcggccctcgagcacgacaaagcctacgaccggcagctcgacagcggagac
aacccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagtttcaggagcgccttaaagaaga
tacgtcttttgggggcaacctcggacgagcagtcttccaggcgaaaaagagggttcttga
acctctgggcctggttgaggaacctgttaagacggctccgggaaaaaagaggccggta
gagcactctcctgtggagccagactcctcctcgggaaccggaaaggcgggccagcagc
ctgcaagaaaaagattgaattttggtcagactggagacgcagactcagtacctgaccccc
agcctctcggacagccaccagcagccccctctggtctgggaactaatacgatggctaca
ggcagtggcgcaccaatggcagacaataacgagggcgccgacggagtgggtaattcct
cgggaaattggcattgcgattccacatggatgggcgacagagtcatcaccaccagcacc
cgaacctgggccctgcccacctacaacaaccacctctacaaacaaatttccagccaatca
ggagcctcgaacgacaatcactactttggctacagcacccctttgggggtattttgacttca
acagattccactgccacttttcaccacgtgactggcaaagactcatcaacaacaactggg
gattccgacccaagagactcaacttcaagctctttaacattcaagtcaaagaggtcacgca
gaatgacggtacgacgacgattgccaataaccttaccagcacggttcaggtgtttactgac
tcggagtaccagctcccgtacgtcctcggctcggcgcatcaaggatgcctcccgccgttc
ccagcagacgtcttcatggtgccacagtatggatacctcaccctgaacaacgggagtcag
gcagtaggacgctcttcattttactgcctggagtactttccttctcagatgctgcgtaccgga
aacaacttttaccttcagctacacttttgaggacgttcctttccacagcagctacgctcacag
ccagagtctggaccgtctcatgaatcctctcatcgaccagtacctgtattacttgagcagaa
caaacactccaagtggaaccaccacgcagtcaaggcttcagttttctcaggccggagcg
agtgacattcgggaccagtctaggaactggcttcctggaccctgttaccgccagcagcga

[0232]

gtatcaaagacatctgcggataacaacaacagtgaatactcgtggactggagctaccaag
taccacctcaatggcagagactctctggtgaatccgggcccggccatggcaagccacaa
ggacgatgaagaaaagtttttttcctcagagcggggttctcatctttgggaagcaaggctca
gagaaaacaaatgtggacattgaaaaggtcatgattacagacgaagaggaaatcaggac
aaccaatcccgtggctacggagcagtatggttctgtatctaccaacctccagagaggcaa
cagacaagcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttcttccaggcatggtctggc
aggacagagatgtgtaccttcaggggcccatctgggcaaagattccacacacggacgg
acattttcacccctctcccctcatgggtggattcggacttaaacaccctcctccacagattct
catcaagaacaccccggtacctgcgaatccttcgaccaccttcagtgcggcaaagtttgct
tccttcatcacacagtactccacgggacaggtcagcgtggagatcgagtgggagctgca
gaaggaaaacagcaaacgctggaatcccgaaattcagtacacttccaactacaacaagt
ctgttaatgtggactttactgtggacactaatggcgtgtattcagagcctcgccccattggc
accagatacctgactcgtaatctgtaattgcttgttaatcaataaaccgtttaattcgtttcagt
tgaactttggtctctgcgtatttctttcttatctagtttccatgctctagactactacgtcacccg
ccccgttcccacgccccgcgccacgtcacaaactccacccccctcattatcatattggcttc
aatccaaaataaggtatattattgatgatgcatcgctggcgtaatagcgaagaggcccgca
ccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggaattccagacgattga
gcgtcaaaatgtaggtatttccatgagcgtttttcctgttgcaatggctggcggtaatattgtt
ctggatattaccagcaaggccgatagtttgagttcttctactcaggcaagtgatgttattact
aatcaaagaagtattgcgacaacggttaatttgcgtgatggacagactcttttactcggtgg
cctcactgattataaaaacacttctcaggattctggcgtaccgttcctgtctaaaatcccttta
atcggcctcctgtttagctcccgctctgattctaacgaggaaagcacgttatacgtgctcgt
caaagcaaccatagtacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggtt
acgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcc
cttcctttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttag
ggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttca
cgtagtgggccatcgccctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttcttt
aatagtggactcttgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttgattt
ataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaac
gcgaattttaacaaaatattaacgtttacaatttaaatatttgcttatacaatcttcctgtttttgg
ggcttttctgattatcaaccggggtacatatgattgacatgctagttttacgattaccgttcat
cgattctcttgtttgctccagactctcaggcaatgacctgatagcctttgtagagacctctca
aaaatagctaccctctccggcatgaatttatcagctagaacggttgaatatcatattgatggt
gatttgactgtctccggcctttctcacccgtttgaatctttacctacacattactcaggcattg
catttaaaatatatgagggttctaaaaatttttatccttgcgttgaaataaaggcttctcccgc
aaaagtattacagggtcataatgtttttggtacaaccgatttagctttatgctctgaggctttat
tgcttaattttgctaattctttgccttgcctgtatgatttattggatgttggaattcctgatgcggt
attttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctg
ctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccct
gacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagct
gcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtg

[0233]

	atacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcag	
47	tcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctcccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgc	辅助质粒_pALD-X80

[0234]

tccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggt
aactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccact
ggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtgg
cctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttac
cttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtgg
ttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgat
cttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatga
gattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaa
agtatatatgagtaaacttggtctgacagttattagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaa
ctgcaatttattcatatcaggattatcaataccatatttttgaaaaagccgtttctgtaatgaag
gagaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctggtatcggtctgcgattc
cgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtg
agaaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagtttatgcatttctttc
cagacttgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcatcaaccaaac
cgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgatcgctgttaaaaggaca
attacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcatcaacaatat
tttcacctgaatcaggatattcttctaatacctggaatgctgtttttccggggatcgcagtggt
gagtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaa
ttccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgcc
atgtttcagaaacaactctggcgcatcgggcttcccatacaagcgatagattgtcgcacct
gattgcccgacattatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaattt
aatcgcggcctcgacgtttcccgttgaatatggctcatactcttccttttcaatattattgaag
catttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaa
atagggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattatta
tcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggt
gatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaa
gcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgt
cggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccataaaatt
gtaaacgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcatttttttaaccaat
aggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagcccgagatagggttgagtg
ttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcg
aaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacccaaatcaagttttttg
gggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagag
cttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggga
gcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacaccc
gccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtactatggttgctttgacgtatgcggtgtga
aataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggc
tgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcg
aaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacga
cgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttaaggtgcacggcccacgtggccactagta
cttctcgacagaagcaccatgtccttgggtccggcctgctgaatgcgcaggcggtcggc

[0235]

catgccccaggcttcgttttgacatcggcgcaggtctttgtagtagtcttgcatgagcctttc
taccggcacttcttcttctccttcctcttgtcctgcatctcttgcatctatcgctgcggcggcg
gcggagtttggccgtaggtggcgccctcttcctcccatgcgtgtgaccccgaagcccctc
atcggctgaagcagggctaggtcggcgacaacgcgctcggctaatatggcctgctgcac
ctgcgtgagggtagactggaagtcatccatgtccacaaagcggtggtatgcgcccgtgtt
gatggtgtaagtgcagttggccataacggaccagttaacggtctggtgacccggctgcga
gagctcggtgtacctgagacgcgagtaagccctcgagtcaaatacgtagtcgttgcaagt
ccgcaccaggtactggtatcccaccaaaaagtgcggcggcggctggcggtagagggg
ccagcgtagggtggccggggctccgggggcgagatcttccaacataaggcgatgatat
ccgtagatgtacctggacatccaggtgatgccggcggcggtggtggaggcgcgcggaa
agtcgcggacgcggttccagatgttgcgcagcggcaaaaagtgctccatggtcgggac
gctctggccggtcaggcgcgcgcaatcgttgacgctctagcgtgcaaaaggagagcct
gtaagcgggcactcttccgtggtctggtggataaattcgcaagggtatcatggcggacga
ccggggttcgagccccgtatccggccgtccgccgtgatccatgcggttaccgcccgcgt
gtcgaacccaggtgtgcgacgtcagacaacgggggagtgctccttttggcttccttccag
gcgcggcggctgctgcgctagcttttttggccactggccgcgcgcagcgtaagcggtta
ggctggaaagcgaaagcattaagtggctcgctccctgtagccggagggttattttccaag
ggttgagtcgcgggacccccggttcgagtctcggaccggccggactgcggcgaacgg
gggtttgcctccccgtcatgcaagaccccgcttgcaaattcctccggaaacagggacga
gccccttttttgcttttcccagatgcatccggtgctgcggcagatgcgccccctcctcagc
agcggcaagagcaagagcagcggcagacatgcagggcaccctccctcctcctaccg
cgtcaggaggggcgacatccgcggttgacgcggcagcagatggtgattacgaaccccc
gcggcgccgggcccggcactacctggacttggaggagggcgagggcctggcgcggc
taggagcgccctctcctgagcggcacccaagggtgcagctgaagcgtgatacgcgtga
ggcgtacgtgccgcggcagaacctgtttcgcgaccgcgagggagaggagcccgagga
gatgcgggatcgaaagttccacgcagggcgcgagctgcggcatggcctgaatcgcgag
cggttgctgcgcgaggaggactttgagcccgacgcgcgaaccgggattagtcccgcgc
gcgcacacgtggcggccgccgacctggtaaccgcatacgagcagacggtgaaccagg
agattaactttcaaaaaagctttaacaaccacgtgcgtacgcttgtggcgcgcgaggaggt
ggctataggactgatgcatctgtgggactttgtaagcgcgctggagcaaaacccaaatag
caagccgctcatggcgcagctgttccttatagtgcagcacagcagggacaacgaggcat
tcagggatgcgctgctaaacatagtagagcccgagggccgctggctgctcgatttgataa
acatcctgcagagcatagtggtgcaggagcgcagcttgagcctggctgacaaggtggc
cgccatcaactattccatgcttagcctgggcaagttttacgcccgcaagatataccatacc
cttacgttcccatagacaaggaggtaaagatcgaggggttctacatgcgcatggcgctga
aggtgcttaccttgagcgacgacctgggcgtttatcgcaacgagcgcatccacaaggcc
gtgagcgtgagccggcggcgcgagctcagcgaccgcgagctgatgcacagcctgcaa
agggccctggctggcacgggcagcggcgatagagaggccgagtcctactttgacgcg
ggcgctgacctgcgctgggccccaagccgacgcgccctggaggcagctggggccgg
acctgggctggcggtggcacccgcgcgcgctggcaacgtcggcggcgtggaggaata
tgacgaggacgatgagtacgagccagaggacggcgagtactaagcggtgatgtttctga

[0236]

tcagatgatgcaagacgcaacggacccggcggtgcgggcggcgctgcagagccagcc
gtccggccttaactccacggacgactggcgccaggtcatggaccgcatcatgtcgctga
ctgcgcgcaatcctgacgcgttccggcagcagccgcaggccaaccggctctccgcaatt
ctggaagcggtggtcccggcgcgcgcaaacccacgcacgagaaggtgctggcgatc
gtaaacgcgctggccgaaaacagggccatccggcccgacgaggccggcctggtctac
gacgcgctgcttcagcgcgtggctcgttacaacagcggcaacgtgcagaccaacctgg
accggctggtgggggatgtgcgcgaggccgtggcgcagcgtgagcgcgcgcagcag
cagggcaacctgggctccatggttgcactaaacgccttcctgagtacacagcccgccaa
cgtgccgcggggacaggaggactacaccaactttgtgagcgcactgcggctaatggtg
actgagacaccgcaaagtgaggtgtaccagtctgggccagactatttttccagaccagta
gacaaggcctgcagaccgtaaacctgagccaggctttcaaaaacttgcaggggctgtgg
ggggtgcgggctcccacaggcgaccgcgcgaccgtgtctagcttgctgacgcccaact
cgcgcctgttgctgctgctaatagcgcccttcacggacagtggcagcgtgtcccgggac
acatacctaggtcacttgctgacactgtaccgcgaggccataggtcaggcgcatgtggac
gagcatactttccaggagattacaagtgtcagccgcgcgctggggcaggaggacacgg
gcagcctggaggcaaccctaaactacctgctgaccaaccggcggcagaagatccctc
gttgcacagtttgcacccttggcgcatcccattctccagtaactttatgtccatgggcgcac
tcacagacctgggccaaaaccttctctacgccaactccgcccacgcgctagacatgacttt
tgaggtggatcccatggacgagcccacccttctttatgttttgtttgaagtctttgacgtggtc
cgtgtgcaccagccgcaccgcggcgtcatcgaaaccgtgtacctgcgcacgcccttctc
ggccggcaacgccacaacataaagaagcaagcaacatcaacaacagctgccgccatg
ggctccagtgagcaggaactgaaagccattgtcaaagatcttggttgtgggccatatttttt
gggcacctatgacaagcgctttccaggctttgtttctccacacaagctcgcctgcgccata
gtcaatacggccggtcgcgagactgggggcgtacactggatggcctttgcctggaaccc
gcactcaaaaacatgctacctctttgagcccttggcttttctgaccagcgactcaagcagg
tttaccagtttgagtacgagtcactcctgcgccgtagcgccattgcttcttcccccgaccgc
tgtataacgctggaaaagtccacccaaagcgtacaggggcccaactcggccgcctgtgg
actattctgctgcatgtttctccacgcctttgccaactggccccaaactcccatggatcaca
accccaccatgaaccttattaccggggtacccaactccatgctcaacagtccccaggtac
agcccaccctgcgtcgcaaccaggaacagctctacagcttcctggagcgccactcgccc
tacttccgcagccacagtgcgcagattaggagcgccacttcttttgtcacttgaaaaacat
gtaaaaataatgtactagagacactttcaataaaggcaaatgcttttatttgtacactctcgg
gtgattatttacccccacccttgccgtctgcgccgtttaaaaatcaaaggggttctgccgcg
catcgctatgcgccactggcagggacacgttgcgatactggtgtttagtgctccacttaaa
ctcaggcacaaccatccgcggcagctcggtgaagttttcactccacaggctgcgcaccat
caccaacgcgtttagcaggtcgggcgccgatatcttgaagtcgcagttggggcctccgc
cctgcgcgcgcgagttgcgatacacagggttgcagcactggaacactatcagcgccgg
gtggtgcacgctggccagcacgctcttgtcggagatcagatccgcgtccaggtcctccg
cgttgctcagggcgaacggagtcaactttggtagctgccttcccaaaaagggcgcgtgc
ccaggctttgagttgcactcgcaccgtagtggcatcaaaaggtgaccgtgcccggtctgg
gcgttaggatacagcgcctgcataaaagccttgatctgcttaaaagccacctgagcctttg

[0237]

cgccttcagagaagaacatgccgcaagacttgccggaaaactgattggccggacaggc
cgcgtcgtgcacgcagcaccttgcgtcggtgttggagatctgcaccacatttcggcccca
ccggttcttcacgatcttggccttgctagactgctccttcagcgcgcgctgcccgttttcgct
cgtcacatccatttcaatcacgtgctccttatttatcataatgcttccgtgtagacacttaagct
cgccttcgatctcagcgcagcggtgcagccacaacgcgcagcccgtgggctcgtgatg
cttgtaggtcacctctgcaaacgactgcaggtacgcctgcaggaatcgccccatcatcgt
cacaaaggtcttgttgctggtgaaggtcagctgcaacccgcggtgctcctcgttcagcca
ggtcttgcatacggccgccagagcttccacttggtcaggcagtagtttgaagttcgccttta
gatcgttatccacgtggtacttgtccatcagcgcgcgcgcagcctccatgcccttctccca
cgcagacacgatcggcacactcagcgggttcatcaccgtaatttcactttccgcttcgctg
ggctcttcctcttcctcttgcgtccgcataccacgcgccactgggtcgtcttcattcagccg
ccgcactgtgcgcttacctcctttgccatgcttgattagcaccggtgggttgctgaaaccca
ccatttgtagcgccacatcttctctttcttcctcgctgtccacgattacctctggtgatggcgg
gcgctcgggcttgggagaagggcgcttcttttttcttcttgggcgcaatggccaaatccgcc
gccgaggtcgatggccgcgggctgggtgtgcgcggcaccagcgcgtcttgtgatgagt
cttcctcgtcctcggactcgatacgccgcctcatccgctttttgggggcgcccggggagg
cggcggcgacggggacggggacgacacgtcctccatggttgggggacgtcgcgccg
caccgcgtccgcgctcgggggtggtttcgcgctgctcctcttcccgactggccatttccctt
ctcctataggcagaaaaagatcatggagtcagtcgagaagaaggacagcctaaccgcc
ccctctgagttcgccaccaccgcctccaccgatgccgccaacgcgcctaccaccttcccc
gtcgaggcacccccgcttgaggaggaggaagtgattatcgagcaggacccaggttttgt
aagcgaagacgacgaggaccgctcagtaccaacagaggataaaaagcaagaccagga
caacgcagaggcaaacgaggaacaagtcgggcgggggggacgaaaggcatggcgact
acctagatgtgggagacgacgtgctgttgaagcatctgcagcgccagtgcgccattatct
gcgacgcgttgcaagagcgcagcgatgtgcccctcgccatagcggatgtcagccttgcc
tacgaacgccacctattctcaccgcgcgtacccccccaaacgccaagaaaacggcacatg
cgagcccaacccgcgcctcaacttctaccccgtatttgccgtgccagaggtgcttgccac
ctatcacatctttttccaaaactgcaagataccccctatcctgccgtgccaaccgcagccga
gcggacaagcagctggccttgcggcagggcgctgtcatacctgatatcgcctcgctcaa
cgaagtgccaaaaatctttgagggtcttggacgcgacgagaagcgcgcggcaaacgct
ctgcaacaggaaaacagcgaaaatgaaagtcactctggagtgttggtggaactcgaggg
tgacaacgcgcgcctagccgtactaaaacgcagcatcgaggtcacccactttgcctaccc
ggcacttaacctacccccccaaggtcatgagcacagtcatgagtgagctgatcgtgcgcc
gtgcgcagcccctggagagggatgcaaatttgcaagaacaaacagaggagggcctacc
cgcagttggcgacgagcagctagcgcgctggcttcaaacgcgcgagcctgccgacttg
gaggagcgacgcaaactaatgatggccgcagtgctcgttaccgtggagcttgagtgcat
gcagcggttctttgctgacccggagatgcagcgcaagctagaggaaacattgcactaca
cctttcgacagggctacgtacgccaggcctgcaagatctccaacgtggagctctgcaacc
tggtctcctaccttggaattttgcacgaaaaccgccttgggcaaaacgtgcttcattccacg
ctcaagggcgaggcgcgccgcgactacgtccgcgactgcgtttacttatttctatgctaca
cctggcagacggccatgggcgtttggcagcagtgcttggaggagtgcaacctcaagga

[0238]

gctgcagaaactgctaaagcaaaacttgaaggacctatggacggccttcaacgagcgct
ccgtggccgcgcacctggcggacatcattttccccgaacgcctgcttaaaaccctgcaac
agggtctgccagacttcaccagtcaaagcatgttgcagaactttaggaactttatcctaga
gcgctcaggaatcttgcccgccacctgctgtgcacttcctagcgactttgtgcccattaagt
accgcgaatgccctccgccgctttggggccactgctaccttctgcagctagccaactacct
tgcctaccactctgacataatggaagacgtgagcggtgacggtctactggagtgtcactgt
cgctgcaacctatgcaccccgcaccgctccctggtttgcaattcgcagctgcttaacgaaa
gtcaaattatcggtacctttgagctgcagggtccctcgcctgacgaaaagtccgcggctcc
ggggttgaaactcactccggggctgtggacgtcggcttaccttcgcaaatttgtacctgag
gactaccacgcccacgagattaggttctacgaagaccaatcccgcccgcctaatgcgga
gcttaccgcctgcgtcattacccagggccacattcttggccaattgcaagccatcaacaaa
gcccgccaagagtttctgctacgaaagggacgggggtttacttggacccccagtccgg
cgaggagctcaacccaatcccccgccgccgcagccctatcagcagcagccgcgggc
ccttgcttcccaggatggcacccaaaaagaagctgcagctgccgccgccacccacgga
cgaggaggaatactgggacagtcaggcagaggaggttttggacgaggaggaggagga
catgatggaagactgggagagcctagacgaggaagcttccgaggtcgaagaggtgtca
gacgaaacaccgtcaccctcggtcgcattcccctcgccggcgccccagaaatcggcaa
ccggttccagcatggctacaacctccgctcctcaggcgccgccggcactgcccgttcgc
cgacccaaccgtagatgggacaccactggaaccagggccggtaagtccaagcagccg
ccgccgttagcccaagagcaacaacagcgccaaggctaccgctcatggcgcgggcac
aagaacgccatagttgcttgcttgcaagactgtgggggcaacatctccttcgcccgccgct
ttcttctctaccatcacggcgtggccttcccccgtaacatcctgcattactaccgtcatctcta
cagcccatactgcaccggcggcagcggcagcaacagcagcggccacacagaagcaa
aggcgaccggatagcaagactctgacaaagcccaagaaatccacagcggcggcagca
gcaggaggaggagcgctgcgtctggcgcccaacgaacccgtatcgacccgcgagctta
gaaacaggatttttcccactctgtatgctatatttcaacagagcaggggccaagaacaaga
gctgaaaataaaaaacaggtctctgcgatccctcacccgcagctgcctgtatcacaaaag
cgaagatcagcttcggcgcacgctggaagacgcggaggctctcttcagtaaatactgcg
cgctgactcttaaggactagtttcgcgccctttctcaaatttaagcgcgaaaactacgtcatc
tccagcggccacacccggcgccagcacctgttgtcagcgccattatgagcaaggaaatt
cccacgccctacatgtggagttaccagccacaaatgggacttgcggctggagctgccca
agactactcaacccgaataaactacatgagcgcgggacccccacatgatatcccgggtca
acggaatacgcgcccaccgaaaccgaattctcctggaacaggcggctattaccaccaca
cctcgtaataaccttaatccccgtagttggcccgctgccctggtgtaccaggaaagtcccg
ctcccaccactgtggtacttcccagagacgcccaggccgaagttcagatgactaactcag
gggcgcagcttgcgggcggctttcgtcacagggtgcggtcgcccgggcagggtataac
tcacctgacaatcagagggcgaggtattcagctcaacgacgagtcggtgagctcctcgct
tggtctccgtccggacgggacatttcagatcggcggcgccggccgctcttcattcacgcc
tcgtcaggcaatcctaactctgcagacctcgtcctctgagccgcgctctggaggcattgga
actctgcaatttattgaggagtttgtgccatcggtctactttaacccttctcgggacctccc
ggccactatccggatcaatttattcctaactttgacgcggtaaaggactcggcggacggct

[0239]

acgactgaatgttaagtggagaggcagagcaactgcgcctgaaacacctggtccactgt
cgccgccacaagtgctttgcccgcgactccggtgagttttgctactttgaattgcccgagg
atcatatcgagggcccggcgcacggcgtccggcttaccgcccagggagagcttgcccg
tagcctgattcgggagtttacccagcgccccctgctagttgagcgggacaggggaccct
gtgttctcactgtgatttgcaactgtcctaaccctggattacatcaagatcctctagttaatta
actagagtacccggggatcttattccctttaactaataaaaaaaaataataaagcatcactta
cttaaaatcagttagcaaatttctgtccagtttattcagcagcacctccttgccctcctcccag
ctctggtattgcagcttcctcctggctgcaaactttctccacaatctaaatggaatgtcagttt
cctcctgttcctgtccatccgcacccactatcttcatgttgttgcagatgaagcgcgcaaga
ccgtctgaagatacctttcaaccccgtgtatccatatgacacggaaaccggtcctccaactg
tgccttttcttactcctccctttgtatcccccaatgggtttcaagagagtcccccctggggtact
ctctttgcgcctatccgaacctctagttacctccaatggcatgcttgcgctcaaaatgggca
acggcctctctctggacgaggccggcaaccttacctcccaaaatgtaaccactgtgagcc
cacctctcaaaaaaaccaagtcaaacataaacctggaaatatctgcacccctcacagttac
ctcagaagccctaactgtggctgccgccgcacctctaatggtcgcgggcaacacactca
ccatgcaatcacaggccccgctaaccgtgcacgactccaaacttagcattgccacccaa
ggacccctcacagtgtcagaaggaaagctagccctgcaaacatcaggcccccctcaccac
caccgatagcagtacccttactatcactgcctcacccccctctaactactgccactggtagct
tgggcattgacttgaaagagcccatttatacacaaaatggaaaactaggactaaagtacg
gggctcctttgcatgtaacagacgacctaaacactttgaccgtagcaactggtccaggtgt
gactattaataatacttccttgcaaactaaagttactggagccttgggttttgattcacaaggc
aatatgcaacttaatgtagcaggaggactaaggattgattctcaaaacagacgccttatact
tgatgttagttatccgtttgatgctcaaaaccaactaaatctaagactaggacagggccctc
tttttataaactcagcccacaacttggatattaactacaacaaaggcctttacttgtttacagc
ttcaaacaattccaaaaagcttgaggttaacctaagcactgccaaggggttgatgtttgac
gctacagccatagccattaatgcaggagatgggcttgaatttggttcacctaatgcaccaa
acacaaatcccctcaaaacaaaaattggccatggcctagaatttgattcaaacaaggctat
ggttcctaaactaggaactggccttagttttgacagcacaggtgccattacagtaggaaac
aaaaataatgataagctaactttgtggaccacaccagctccatctcctaactgtagactaaa
tgcagagaaagatgctaaactcactttggtcttaacaaaatgtggcagtcaaatacttgcta
cagtttcagttttggctgttaaaggcagtttggctccaatatctggaacagttcaaagtgctc
atcttattataagatttgacgaaaatggagtgctactaaacaattccttcctggacccagaat
attggaactttagaaatggagatcttactgaaggcacagcctatacaaacgctgttggattt
atgcctaacctatcagcttatccaaaatctcacggtaaaactgccaaaagtaacattgtcag
tcaagtttacttaaacggagacaaaactaaacctgtaacactaaccattacactaaacggta
cacaggaaacaggagacacaactccaagtgcatactctatgtcattttcatgggactggtc
tggccacaactacattaatgaaatatttgccacatcctcttacacttttcatacattgcccaa
gaataaagaatcgtttgtgttatgtttcaacgtgtttatttttcaattgcagaaaatttcaagtca
tttttcattcagtagtatagccccaccaccacatagcttatacagatcaccgtaccttaatcaa
actcacagaaccctagtattcaacctgccacctccctcccaacacacagagtacacagtc
ctttctccccggctggccttaaaaagcatcatatcatgggtaacagacatattcttaggtgtt

[0240]

atattccacacggtttcctgtcgagccaaacgctcatcagtgatattaataaactccccgggcagctcacttaagttcatgtcgctgtccagctgctgagccacaggctgctgtccaacttgcggttgcttaacgggcggcgaaggagaagtccacgcctacatgggggtagagtcataatcgtgcatcaggatagggcggtggtgctgcagcagcgcgcgaataaactgctgccgccgccgctccgtcctgcaggaatacaacatggcagtggtctcctcagcgatgattcgcaccgccgcagcataaggcgccttgtcctccgggcacagcagcgcaccctgatctcacttaaatcagcacagtaactgcagcacagcaccacaatattgttcaaaatcccacagtgcaaggcgctgtatccaaagctcatggcggggaccacagaacccacgtggccatcataccacaagcgcaggtagattaagtggcgacccctcataaacacgctggacataaacattacctcttttggcatgttgtaattcaccacctcccggtaccatataaacctctgattaaacatggcgccatccaccaccatcctaaaccagctggccaaaacctgcccgccggctatacactgcagggaaccgggactggaacaatgacagtggagagcccaggactcgtaaccatggatcatcatgctcgtcatgatatcaatgttggcacaacacaggcacacgtgcatacacttcctcaggattacaagctcctcccgcgttagaaccatatcccagggaacaacccattcctgaatcagcgtaaatcccacactgcagggaagacctcgcacgtaactcacgttgtgcattgtcaaagtgttacattcgggcagcagcggatgatcctccagtatggtagcgcgggtttctgtctcaaaaggaggtagacgatccctactgtacggagtgcgccgagacaaccgagatcgtgttggtcgtagtgtcatgccaaatggaacgccggacgtagtcatatttcctgaagcaaaaccaggtgcgggcgtgacaaacagatctgcgtctccggtctcgccgcttagatcgctctgtgtagtagttgtagtatatccactctctcaaagcatccaggcgccccctggcttcgggttctatgtaaactccttcatgcgccgctgccctgataacatccaccaccgcagaataagccacacccagccaacctacacattcgttctgcgagtcacacacgggaggagcgggaagagctggaagaaccatgttttttttttttattccaaaagattatccaaaacctcaaaatgaagatctattaagtgaacgcgctcccctccggtggcgtggtcaaactctacagccaaagaacagataatggcatttgtaagatgttgcacaatggcttccaaaaggcaaacggccctcacgtccaagtggacgtaaaggctaaacccttcagggtgaatctcctctataaacattccagcaccttcaaccatgcccaaataattctcatctcgccaccttctcaatatatctctaagcaaatcccgaatattaagtccggccattgtaaaaatctgctccagagcgccctccaccttcagcctcaagcagcgaatcatgattgcaaaaattcaggttcctcacagacctgtataagattcaaaagcggaacattaacaaaaataccgcgatcccgtaggtcccttcgcagggccagctgaacataatcgtgcaggtctgcacggaccagcgcggccacttccccgccaggaaccatgacaaaagaacccacactgattatgacacgcatactcggagctatgctaaccagcgtagccccgatgtaagcttgttgcatgggcggcgatataaaatgcaaggtgctgctcaaaaaatcaggcaaagcctcgcgcaaaaaagaaagcacatcgtagtcatgctcatgcagataaaggcaggtaagctccggaaccaccacagaaaaagacaccatttttctctcaaacatgtctgcgggtttctgcataaacacaaaataaaataacaaaaaaacatttaaacattagaagcctgtcttacaacaggaaaaacaacccttataagcataagacggactacggccatgccggcgtgaccgtaaaaaaactggtcaccgtgattaaaaagcaccaccgacagctcctcggtcatgtccggagtcataatgtaagactcggtaaacacatcaggttgattcacatcggtcagtgctaaaaagcgaccgaaatagcccgggggaatacatacccgcaggcgtagagacaacattacagcccccataggaggtataacaaaattaataggagagaaaaacacataaacacctgaaaaaccctcctgcctaggcaaaatagcaccctcccgctccagaacaacatacag

		cgcttccacagcggcagccataacagtcagccttaccagtaaaaaagaaaacctattaaa aaaacaccactcgacacggcaccagctcaatcagtcacagtgtaaaaaagggccaagtg cagagcgagtatatataggactaaaaaatgacgtaacggttaaagtccacaaaaaacacc cagaaaaccgcacgcgaacctacgcccagaaacgaaagccaaaaaacccacaacttcc tcaaatcgtcacttccgttttcccacgttacgtcacttcccattttaagaaaactacaattccc aacacatacaagttactccgccctaaaacctacgtcacccgccccgttcccacgccccgc gccacgtcacaaactccacccccctcattatcatattggcttcaatccaaaataatcatcaata atataccttattttggattgaagccaatatgataatgaggggtggagtttgtgacgtggcg cggggcgtgggaacggggcgggtgacgtagtagtgtggcggaagtgtgatgttgcaag tgtggcggaacacatgtaagcgacggatgtggcaaaagtgacgtttttggtgtgcgccgg atccacaggacgggtgtggtcgccatgatcgcgtagtcgatagtggctccaagtagcga agcgagcaggactgggcggcggccaaagcggtcggacagtgctccgagaacgggtg cgcatagaaattgcatcaacgcatatagcgctagcagcacgccatagtgactggcgatgc tgtcggaatggacgatatcccgcaagaggcccggcagtaccggcataaccaagcctatg cctacagcatccagggtgacggtgccgaggatgacgatgagcgcattgttagatttcata cacggtgcctgactgcgttagcaatttaactgtgataaactaccgcattaaagcttatcgaa ttcgtaatcatgtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacat acgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacatt aattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaat gaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgc	
[0241]	48	ccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgct cttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatc agctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaaga acatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctgg cgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcaga ggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctc gtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcggg aagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgct ccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggt aactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccact ggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtgg cctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagtta ccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtg gtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttg atcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcat gagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatc taaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatc tcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacga tacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctca ccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtg gtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagta	辅助+Rep/Cap质粒_pDG-KanR

[0242]

gttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctgcagccatgagattatcaaaaa
ggatcttcacctagatccttttcacgtagaaagccagtccgcagaaacggtgctgacccc
ggatgaatgtcagctactgggctatctggacaagggaaaacgcaagcgcaaagagaaa
gcaggtagcttgcagtgggcttacatggcgatagctagactgggcggttttatggacagc
aagcgaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttgggaagccctgcaaa
gtaaactggatggctttcttgccgccaaggatctgatggcgcaggggatcaagctctgatc
aagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctc
cggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgc
tctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtcaagaccg
acctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggcc
acgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaagggactg
gctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgag
aaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcc
cattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccgg
tcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgtt
cgccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgat
gcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccg
gctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaaga
gcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcg
cagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgaattttgttaaaatttttgttaaat
cagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagа
ccgagatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtgga
ctccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccat
caccctaatcaagttttttggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagg
gagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagg
gaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcg
cgtaaccaccacacccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtccattcgccatt
caggatcgaattaattcttaattaacatcatcaataatataccttattttggattgaagccaata
tgataatgaggggtggagtttgtgacgtggcgcggggcgtgggaacggggcgggtga
cgtagtagtgtggcggaagtgtgatgttgcaagtgtggcggaacacatgtaagcgacgg
atgtggcaaaagtgacgttttggtgtgcgccggtgtacacaggaagtgacaattttcgcg
cggttttaggcggatgttgtagtaaatttgggcgtaaccgagtaagatttggccattttcgcg
ggaaaactgaataagaggaagtgaaatctgaataattttgtgttactcatagcgcgtaatatt
tgtctagggccgcggggactttgaccgtttacgtggagactcgcccaggtgtttttctcag
gtgttttccgcgttccgggtcaaagttggcgttttattattatagtcaggggatcctctagaa
ctagtggatccgtccctagaagtaaaaaagggaaaaaagagtgtgtttgtcaaaatagga
gacaggtggtggcaaccagggacttatagggacctacatctacagaccaacagatgc
ccccttaccatatacaggaagatatgacttaaattgggataggtgggtcacaatcaacggc
tataaagtgttatacagatccctccccttcgtgaaagactcgccagagctagacctccttg
gtgtatgctaactgagaaagagaaagacgacatgaaacaacaggtacatgattatatttat
ctaggaacaggaatgcacttttggggaaaggttttccataccaaggaaggggcagtggct

[0243]

ggactgatagaacattattctgcaaaaacttatggtatgagttattatgattagcctttatttgc
ccaaccttgcggttcccagggtttaaataagtttatggttacaaactgttcttaaaacaagga
tgtgagacaagtggtttcctgagttggtttggtatcaaatgttctgatctgagctcttagtgttc
tattttcctatgttcttttggaatctatccaagtcttatgtaaatgcttatgtaaaccataatataa
aagagtgctgatttttgagtaaacttgcaacagtcctaacattcttctctcgtgtgtttgtgtct
gttcgccatcccgtctccgctcgtcacttatccttcacttttcagagggtccccccgcagatc
ccggtcaccctcaggtcgggacctgcagaagacgcccgagtgagcacgcagggtctcc
attttgaagcgggaggtttgaacgcgcagccgccatgccggggttttacgagattgtgatt
aaggtccccagcgaccttgacgagcatctgcccggcatttctgacagctttgtgaactgg
gtggccgagaaggaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgag
caggcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaatggcgcc
gtgtgagtaaggccccggaggccctttctttgtgcaatttgagaagggagagagctactt
ccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccggggtgaaatccatggttttgggacgtttcctg
agtcagattcgcgaaaaactgattcagagaatttaccgcgggatcgagccgactttgcca
aactggttcgcggtcacaaagaccagaaatggcgccggaggcgggaacaaggtggtg
gatgagtgctacatccccaattacttgctccccaaaacccagcctgagctccagtgggcgt
ggactaatatggaacagtatttaagcgcctgtttgaatctcacggagcgtaaacggttggt
ggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaacaaagagaatcagaa
tcccaattctgatgcgccggtgatcagatcaaaaacttcagccaggtacatggagctggtc
gggtggctcgtggacaaggggattacctcggagaagcagtggatccaggaggaccag
gcctcatacatctccttcaatgcggcctccaactcgcggtcccaaatcaaggctgccttgg
acaatgcgggaaagattatgagcctgactaaaaccgccccgactacctggtgggccag
cagcccgtggaggacatttccagcaatcggatttataaaattttggaactaaacgggtacg
atccccaatatgcggcttccgtctttctgggatgggccacgaaaaagttcggcaagagga
acaccatctggctgtttgggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccata
gcccacactgtgcccttctacgggtgcgtaaactggaccaatgagaactttcccttcaacg
actgtgtcgacaagatggtgatctggtgggaggaggggaagatgaccgccaaggtcgt
ggagtcggccaaagccattctcggaggaagcaaggtgcgcgtggaccagaaatgcaa
gtcctcggcccagatagacccgactcccgtgatcgtcacctccaacaccaacatgtgcgc
cgtgattgacgggaactcaacgaccttcgaacaccagcagccgttgcaagaccggatgt
tcaaatttgaactcacccgccgtctggatcatgactttgggaaggtcaccaagcaggaagt
caaagacttttccggtgggcaaaggatcacgtggttgaggtggagcatgaattctacgtc
aaaaagggtggagccaagaaaagacccgcccccagtgacgcagatataagtgagccc
aaacgggtgcgcgagtcagttgcgcagccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatca
actacgcagacaggtaccaaaacaaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgtt
tccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcactcacggacag
aaagactgtttagagtgctttcccgtgtcagaatctcaacccgtttctgtcgtcaaaaaggc
gtatcagaaactgtgctacattcatcatatcatgggaaaggtgccagacgcttgcactgcc
tgcgatctggtcaatgtggatttggatgactgcatctttgaacaataaatgatttaaatcaggt
atggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacactctctctgaaggaataagac
agtggtggaagctcaaacctggcccaccaccaccaaagcccgcagagcggcataagg

[0244]

acgacagcaggggtcttgtgcttcctgggtacaagtacctcggacccttcaacggactcg
acaagggagagccggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacgacaaagcc
tacgaccggcagctcgacagcggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgccgacg
cggagtttcaggagcgccttaaagaagatacgtctttgggggcaacctcggacgagca
gtcttccaggcgaaaaagagggttcttgaacctctgggcctggttgaggaacctgttaaga
cggctccgggaaaaaagaggccggtagagcactctcctgtggagccagactcctcctc
gggaaccggaaaggcgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaattttggtcagact
ggagacgcagactcagtacctgaccccagcctctcggacagccaccagcagcccct
ctggtctgggaactaatacgatggctacaggcagtggcgcaccaatggcagacaataac
gagggcgccgacggagtgggtaattcctcgggaaattggcattgcgattccacatggat
gggcgacagagtcatcaccaccagcacccgaacctgggccctgcccacctacaacaac
cacctctacaaacaaatttccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcactactttggct
acagcacccctgggggtattttgacttcaacagattccactgccacttttcaccacgtgact
ggcaaagactcatcaacaacaactggggattccgacccaagagactcaacttcaagctct
ttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacggtacgacgacgattgccaataacc
ttaccagcacggttcaggtgtttactgactcggagtaccagctcccgtacgtcctcggctc
ggcgcatcaaggatgcctcccgccgttcccagcagacgtcttcatggtgccacagtatgg
atacctcaccctgaacaacgggagtcaggcagtaggacgctcttcattttactgcctggag
tactttccttctcagatgctgcgtaccggaaacaactttaccttcagctacacttttgaggac
gttcctttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatcctctcat
cgaccagtacctgtattacttgagcagaacaaacactccaagtggaaccaccacgcagtc
aaggcttcagttttctcaggccggagcgagtgacattcgggaccagtctaggaactggctt
cctggaccctgttaccgccagcagcgagtatcaaagacatctgcggataacaacaacag
tgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaat
ccgggcccggccatggcaagccacaaggacgatgaagaaaagtttttttcctcagagcg
gggttctcatctttgggaagcaaggctcagagaaaacaaatgtggacattgaaaaggtca
tgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatcccgtggctacggagcagtatggt
tctgtatctaccaacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacac
acaaggcgttcttccaggcatggtctggcaggacagagatgtgtaccttcaggggcccat
ctgggcaaagattccacacacggacggacattttcacccctctcccctcatgggtggattc
ggacttaaacaccctcctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatcctt
cgaccaccttcagtgcggcaaagtttgcttccttcatcacacagtactccacgggacaggt
cagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaaacgctggaatcccga
aattcagtacacttccaactacaacaagtctgttaatgtggactttactgtggacactaatgg
cgtgtattcagagcctcgccccattggcaccagatacctgactcgtaatctgtaattgcttgt
taatcaataaaccgtttaattcgtttcagttgaactttggtctctgcgtatttctttcttatctagtt
tccatggctacatcagcttatcgatgcatgtccttgggtccggcctgctgaatgcgcaggc
ggtcggccatgccccaggcttcgttttgacatcggcgcaggtctttgtagtagtcttgcatg
agcctttctaccggcacttcttcttctccttcctcttgtcctgcatctcttgcatctatcgctgcg
gcggcggcggagtttggccgtaggtggcgccctcttcctcccatcgtgtgaccccgaag
cccctcatcggctgaagcagggctaggtcggcgacaacgcgctcggctaatatggcctg

[0245]

ctgcacctgcgtgagggtagactggaagtcatccatgtccacaaagcggtggtatgcgc
ccgtgttgatggtgtaagtgcagttggccataacggaccagttaacggtctggtgacccg
gctgcgagagctcggtgtacctgagacgcgagtaagccctcgagtcaaatacgtagtcg
ttacaagtccgcaccaggtactggtatcccaccaaaaagtgcggcggcggctggcggta
gaggggccagcgtagggtggccggggctccgggggcgagatcttccaacataaggcg
atgatatccgtagatgtacctggacatccaggtgatgccggcggcggtggtggaggcgc
gcggaaagtcgcggacgcggttccagatgttgcgcagcggcaaaaagtgctccatggt
cgggacgctctggccggtcaggcgcgcgcaatcgttgacgctctagaccgtgcaaaag
gagagcctgtaagcgggcactcttccgtggtctggtggataaattcgcaagggtatcatg
gcggacgaccggggttcgagccccgtatccggccgtccgccgtgatccatgcggttacc
gcccgcgtgtcgaacccaggtgtgcgacgtcagacaacgggggagtgctccttttggctt
ccttccaggcgcggcggctgctgcgctagctttttttggccactggccgcgcgcagcgtaa
gcggttaggctggaaagcgaaagcattaagtggctcgctccctgtagccggagggttatt
ttccaagggttgagtcgcgggacccccggttcgagtctcggaccggccggactgcggc
gaacgggggtttgtctccccgtcatgcaagacccccgcttgcaaattcctccggaaacagg
gacgagccccttttttgcttttcccagatgcatccggtgctgcggcagatgcgcccccctc
ctcagcagcggcaagagcaagagcagcggcagacatgcagggcaccctcccctcctc
ctaccgcgtcaggaggggcgacatccgcggttgacgcggcagcagatggtgattacga
acccccgcggcgccgggcccggcactacctggacttggaggagggcgagggcctgg
cgcggctaggagcgccctctcctgagcggcacccaagggtgcagctgaagcgtgatac
gcgtgaggcgtacgtgccgcggcagaacctgtttcgcgaccgcgagggagaggagcc
cgaggagatgcgggatcgaaagttccacgcagggcgcgagctgcggcatggcctgaat
cgcgagcggttgctgcgcgaggaggactttgagcccgacgcgcgaaccgggattagtc
ccgcgcgcgcacacgtggcggccgccgacctggtaaccgcatacgagcagacggtga
accagggcgatcgcacccttggcgcatcccattctccagtaactttatgtccatgggcgc
actcacagacctgggccaaaaccttctctacgccaactccgcccacgcgctagacatga
cttttgaggtggatcccatggacgagcccacccttctttatgttttgtttgaagtctttgacgt
ggtccgtgtgcaccagccgcaccgcggcgtcatcgaaaccgtgtacctgcgcacgccct
tctcggccggcaacgccacaacataaagaagcaagcaacatcaacaacagctgccgcc
atgggctccagtgagcaggaactgaaagccattgtcaaagatcttggttgtgggccatatt
ttttgggcacctatgacaagcgctttccaggctttgtttctccacacaagctcgcctgcgcc
atagtcaatacggccggtcgcgagactgggggcgtacactggatggcctttgcctggaa
cccgcactcaaaaacatgctacctctttgagccctttggcttttctgaccagcgactcaagc
aggtttaccagtttgagtacgagtcactcctgcgccgtagcgccattgcttcttccccgac
cgctgtataacgctggaaaagtccacccaaagcgtacaggggcccaactcggccgcct
gtggactattctgctgcatgtttctccacgcctttgccaactggccccaaactcccatggat
cacaaccccaccatgaaccttattaccggggtacccaactccatgctcaacagtccccag
gtacagcccaccctgcgtcgcaaccaggaacagctctacagcttcctggagcgccactc
gccctacttccgcagccacagtgcgcagattaggagcgccacttctttttgtcacttgaaaa
acatgtaaaaataatgtactagagacactttcaataaaggcaaatgcttttatttgtacactct
cgggtgattatttacccccacccttgccgtctgcgccgtttaaaaatcaaaggggttctgcc

[0246]

gcgcatcgctatgcgccactggcagggacacgttgcgatactggtgtttagtgctccactt
aaactcaggcacaaccatccgcggcagctcggtgaagttttcactccacaggctgcgca
ccatcaccaacgcgtttagcaggtcgggcgccgatatcttgaagtcgcagttggggcctc
cgccctgcgcgcgcgagttgcgatacacagggttgcagcactggaacactatcagcgc
cgggtggtgcacgctggccagcacgctcttgtcggagatcagatccgcgtccaggtcct
ccgcgttgctcagggcgaacggagtcaactttggtagctgccttcccaaaaagggcgcg
tgcccaggctttgagttgcactcgcaccgtagtggcatcaaaaggtgaccgtgcccggtc
tgggcgttaggatacagcgcctgcataaaagccttgatctgcttaaaagccacctgagcct
ttgcgccttcagagaagaacatgccgcaagacttgccggaaaactgattggccggacag
gccgcgtcgtgcacgcagcaccttgcgtcggtgttggagatctgcaccacatttcggccc
caccggttcttcacgatcttggccttgctagactgctccttcagcgcgcgctgcccgttttc
gctcgtcacatccatttcaatcacgtgctccttatttatcataatgcttccgtgtagacacttaa
gctcgccttcgatctcagcgcagcggtgcagccacaacgcgcagcccgtgggctcgtg
atgcttgtaggtcacctctgcaaacgactgcaggtacgcctgcaggaatcgccccatcat
cgtcacaaaggtcttgttgctggtgaaggtcagctgcaacccgcggtgctcctcgttcagc
caggtcttgcatacggccgccagagcttccacttggtcaggcagtagtttgaagttcgcct
ttagatcgttatccacgtggtacttgtccatcagcgcgcgcgcagcctccatgcccttctcc
cacgcagacacgatcggcacactcagcgggttcatcaccgtaatttcactttccgcttcgc
tgggctcttcctcttcctcttgcgtccgcataccacgcgccactgggtcgtcttcattcagcc
gccgcactgtgcgcttacctcctttgccatgcttgattagcaccggtgggttgctgaaaccc
accatttgtagcgccacatcttctctttcttcctcgctgtccacgattacctctggtgatggcg
ggcgctcgggcttgggagaagggcgcttcttttttcttcttgggcgcaatggccaaatccgc
cgccgaggtcgatggccgcgggctgggtgtgcgcggcaccagcgcgtcttgtgatgag
tcttcctcgtcctcggactcgatacgccgcctcatccgcttttttgggggcgcccggggag
gcggcggcgacggggacggggacgacacgtcctccatggttgggggacgtcgcgcc
gcaccgcgtccgcgctcgggggtggtttcgcgctgctcctcttcccgactggccatttcct
tctcctataggcagaaaaagatcatggagtcagtcgagaagaaggacagcctaaccgcc
ccctctgagttcgccaccaccgcctccaccgatgccgccaacgcgcctaccaccttcccc
gtcgaggcacccccgcttgaggaggaggaagtgattatcgagcaggacccaggttttgt
aagcgaagacgacgaggaccgctcagtaccaacagaggataaaaagcaagaccagga
caacgcagaggcaaacgaggaacaagtcgggcgggggacgaaaggcatggcgact
acctagatgtgggagacgacgtgctgttgaagcatctgcagcgccagtgcgccattatct
gcgacgcgttgcaagagcgcagcgatgtgcccctcgccatagcggatgtcagccttgcc
tacgaacgccacctattctcaccgcgcgtacccccaaacgccaagaaaacggcacatg
cgagcccaacccgcgcctcaacttctaccccgtatttgccgtgccagaggtgcttgccac
ctatcacatctttttccaaaactgcaagataccctatcctgccgtgccaaccgcagccga
gcggacaagcagctggccttgcggcagggcgctgtcatacctgatatcgcctcgctcaa
cgaagtgccaaaaatctttgagggtcttggacgcgacgagaagcgcgcggcaaacgct
ctgcaacaggaaaacagcgaaaatgaaagtcactctggagtgttggtggaactcgaggg
tgacaacgcgcgcctagccgtactaaaacgcagcatcgaggtcacccactttgcctaccc
ggcacttaacctacccccaaggtcatgagcacagtcatgagtgagctgatcgtgcgcc

[0247]

gtgcgcagcccctggagagggatgcaaatttgcaagaacaaacagaggagggcctacc
cgcagttggcgacgagcagctagcgcgctggcttcaaacgcgcgagcctgccgacttg
gaggagcgacgcaaactaatgatggccgcagtgctcgttaccgtggagcttgagtgcat
gcagcggttctttgctgacccggagatgcagcgcaagctagaggaaacattgcactaca
cctttcgacagggctacgtacgccaggcctgcaagatctccaacgtggagctctgcaacc
tggtctcctaccttggaattttgcacgaaaaccgccttgggcaaaacgtgcttcattccacg
ctcaagggcgaggcgcgccgcgactacgtccgcgactgcgtttacttatttctatgctaca
cctggcagacggccatgggcgtttggcagcagtgcttggaggagtgcaacctcaaggga
gctgcagaaactgctaaagcaaaacttgaaggacctatggacggccttcaacgagcgct
ccgtggccgcgcacctggcggacatcattttccccgaacgcctgcttaaaaccctgcaac
agggtctgccagacttcaccagtcaaagcatgttgcagaactttaggaactttatcctaga
gcgctcaggaatcttgcccgccacctgctgtgcacttcctagcgactttgtgcccattaagt
accgcgaatgccctccgccgctttggggccactgctaccttctgcagctagccaactacct
tgcctaccactctgacataatggaagacgtgagcggtgacggtctactggagtgtcactgt
cgctgcaacctatgcaccccgcaccgctccctggtttgcaattcgcagctgcttaacgaaa
gtcaaattatcggtacctttgagctgcagggtccctcgcctgacgaaaagtccgcggctcc
ggggttgaaactcactccggggctgtggacgtcggcttaccttcgcaaatttgtacctgag
gactaccacgcccacgagattaggttctacgaagaccaatcccgcccgcctaatgcgga
gcttaccgcctgcgtcattacccagggccacattcttggccaattgcaagccatcaacaaa
gcccgccaagagtttctgctacgaaagggacgggggtttacttggacccccagtccgg
cgaggagctcaacccaatcccccccgccgccgcagccctatcagcagcagccgcgggc
ccttgcttcccaggatggcacccaaaaagaagctgcagctgccgccgccacccacggga
cgaggaggaatactgggacagtcaggcagaggaggttttggacgaggaggaggaggga
catgatggaagactgggagagcctagacgaggaagcttccgaggtcgaagaggtgtca
gacgaaacaccgtcaccctcggtcgcattcccctcgccggcgccccagaaatcggcaa
ccggttccagcatggctacaacctccgctcctcaggcgccgccggcactgcccgttcgc
cgacccaaccgtagatgggacaccactggaaccagggccggtaagtccaagcagccg
ccgccgttagcccaagagcaacaacagcgccaaggctaccgctcatggcgcgggcac
aagaacgccatagttgcttgcttgcaagactgtgggggcaacatctccttcgcccgccgct
ttcttctctaccatcacggcgtggccttcccccgtaacatcctgcattactaccgtcatctcta
cagcccatactgcaccggcggcagcggcagcaacagcagcggccacacagaagcaa
aggcgaccggatagcaagactctgacaaagcccaagaaatccacagcggcggcagca
gcaggaggaggagcgctgcgtctggcgcccaacgaacccgtatcgacccgcgagctta
gaaacaggatttttcccactctgtatgctatatttcaacagagcaggggccaagaacaaga
gctgaaaataaaaaacaggtctctgcgatccctcacccgcagctgcctgtatcacaaaag
cgaagatcagcttcggcgcacgctggaagacgcggaggctctcttcagtaaatactgcg
cgctgactcttaaggactagtttcgcgccctttctcaaatttaagcgcgaaaactacgtcatc
tccagcggccacacccggcgccagcacctgttgtcagcgccattatgagcaaggaaatt
cccacgccctacatgtggagttaccagccacaaatgggacttgcggctggagctgccca
agactactcaacccgaataaactacatgagcgcgggaccccacatgatatcccgggtca
acggaatacgcgcccaccgaaaccgaattctcctggaacaggcggctattaccaccaca

[0248]

cctcgtaataaccttaatccccgtagttggcccgctgccctggtgtaccaggaaagtcctg
ctcccaccactgtggtacttcccagagacgcccaggccgaagttcagatgactaactcag
gggcgcagcttgcgggcggctttcgtcacagggtgcggtcgcccgggcagggtataac
tcacctgacaatcagagggcgaggtattcagctcaacgacgagtcggtgagctcctcgct
tggtctccgtccggacgggacatttcagatcggcggcgccggccgctcttcattcacgcc
tcgtcaggcaatcctaactctgcagacctcgtcctctgagccgcgctctggaggcattgga
actctgcaatttattgaggagtttgtgccatcggtctactttaacccctctcgggacctccc
ggccactatccggatcaatttattcctaactttgacgcggtaaaggactcggcggacggct
acgactgaatgttaagtggagaggcagagcaactgcgcctgaaacacctggtccactgt
cgccgccacaagtgctttgcccgcgactccggtgagttttgctactttgaatcgcccgagg
atcatatcgagggcccggcgcacggcgtccggcttaccgcccagggagagcttgcccg
tagcctgattcgggagtttacccagcgccccctgctagttgagcgggacaggggaccct
gtgttctcactgtgatttgcaactgtcctaaccctggattacatcaagatctttgttgccatctc
tgtgctgagtataataaatacagaaattaaaatatactggggctcctatcgccatcctgtaaa
cgccaccgtcttcacccgcccaagcaaaccaaggcgaaccttacctggtacttttaacatc
tctccctctgtgatttacaacagtttcaacccagacggagtgagtctacgagagaacctctc
cgagctcagctactccatcagaaaaaacaccaccctccttacctgccgggaacgtacga
gtgcgtcaccggccgctgcaccacacctaccgcctgaccgtaaaccagacttttccggga
cagacctcaataactctgtttaccagaacaggaggtgagcttagaaaaccccttagggtatt
aggccaaaggcgcagctactgtggggtttatgaacaattcaagcaactctacgggctattc
taattcaggtttctctagaaatggacggaattattacagagcagcgcctgctagaaagacg
cagggcagcggccgagcaacagcgcatgaatcaagagctccaagacatggttaacttg
caccagtgcaaaaggggtatcttttgtctggtaaagcaggccaaagtcacctacgacagt
aataccaccggacaccgccttagctacaagttgccaaccaagcgtcagaaattggtggtc
atggtgggagaaaagcccattaccataactcagcactcggtagaaaccgaaggctgcatt
cactcaccttgtcaaggacctgaggatctctgcacccttattaagaccctgtgcggtctcaa
agatcttattccctttaactaataaaaaaaaataataaagcatcacttacttaaaatcagttag
caaatttctgtccagtttattcagcagcacctccttgccctcctcccagctctggtattgcag
cttcctcctggctgcaaactttctccacaatctaaatggaatgtcagtttcctcctgttcctgtc
catccgcacccactatcttcatgttgttgcagatgaagcgcgcaagaccgtctgaagatac
cttcaaccccgtgtatccatatgacacggaaaccggtcctccaactgtgccttttcttactcc
tccctttgtatcccccaatgggtttcaagagagtcccctggggtactctctttgcgcctatc
cgaacctctagttacctccaatggcatgcttgcgctcaaaatgggcaacggcctctctctg
gacgaggccggcaaccttacctcccaaaatgtaaccactgtgagcccacctctcaaaaa
aaccaagtcaaacataaacctggaaatatctgcacccctcacagttacctcagaagcccta
actgtggctgccgccgcacctctaatggtcgcgggcaacacactcaccatgcaatcaca
ggccccgctaaccgtgcacgactccaaacttagcattgccacccaaggacccctcacag
tgtcagaaggaaagctagccctgcaaacatcaggccccctcaccaccaccgatagcagt
acccttactatcactgcctcaccccctctaactactgccactggtagcttgggcattgacttg
aaagagcccatttatacacaaaatggaaaactaggactaaagtacggggctcctttgcatg
taacagacgacctaaacactttgaccgtagcaactggtccaggtgtgactattaataatact

[0249]

tccttgcaaactaaagttactggagccttgggttttgattcacaaggcaatatgcaacttaat
gtagcaggaggactaaggattgattctcaaaacagacgccttatacttgatgttagttatcc
gtttgatgctcaaaaccaactaaatctaagactaggacagggccctcttttataaactcag
cccacaacttggatattaactacaacaaaggcctttacttgtttacagcttcaaacaattcca
aaaagcttgaggttaacctaagcactgccaaggggttgatgtttgacgctacagccatagc
cattaatgcaggagatgggcttgaatttggttcacctaatgcaccaaacacaaatcccctc
aaaacaaaaattggccatggcctagaatttgattcaaacaaggctatggttcctaaactag
gaactggccttagttttgacagcacaggtgccattacagtaggaaacaaaaataatgataa
gctaactttgtggaccacaccagctccatctcctaactgtagactaaatgcagagaaagat
gctaaactcactttggtcttaacaaaatgtggcagtcaaatacttgctacagtttcagttttgg
ctgttaaaggcagtttggctccaatatctggaacagttcaaagtgctcatcttattataagatt
tgacgaaaatggagtgctactaaacaattccttcctggacccagaatattggaactttagaa
atggagatcttactgaaggcacagcctatacaaacgctgttggatttatgcctaacctatca
gcttatccaaaatctcacggtaaaactgccaaaagtaacattgtcagtcaagtttacttaaac
ggagacaaaactaaacctgtaacactaaccattacactaaacggtacacaggaaacagg
agacacaactccaagtgcatactctatgtcattttcatgggactggtctggccacaactaca
ttaatgaaatatttgccacatcctcttacacttttcatacattgcccaagaataaagaatcgtt
tgtgttatgtttcaacgtgtttatttttcaattgcagaaaatttcaagtcatttttcattcagtagta
tagccccaccaccacatagcttatacagatcaccgtaccttaatcaaactcacagaaccct
agtattcaacctgccacctccctcccaacacacagagtacacagtcctttctccccggctg
gccttaaaaagcatcatatcatgggtaacagacatattcttaggtgttatattccacacggttt
cctgtcgagccaaacgctcatcagtgatattaataaactccccgggcagctcacttaagtt
catgtcgctgtccagctgctgagccacaggctgctgtccaacttgcggttgcttaacgggc
ggcgaaggagaagtccacgcctacatgggggtagagtcataatcgtgcatcaggatag
ggcggtggtgctgcagcagcgcgcgaataaactgctgccgccgccgctccgtcctgca
ggaatacaacatggcagtggtctcctcagcgatgattcgcaccgcccgcagcataaggc
gccttgtcctccgggcacagcagcgcaccctgatctcacttaaatcagcacagtaactgc
agcacagcaccacaatattgttcaaaatcccacagtgcaaggcgctgtatccaaagctcat
ggcggggaccacagaacccacgtggccatcataccacaagcgcaggtagattaagtgg
cgacccctcataaacacgctggacataaacattacctcttttggcatgttgtaattcaccacc
tcccggtaccatataaacctctgattaaacatggcgccatccaccaccatcctaaaccagc
tggccaaaacctgcccgccggctatacactgcagggaaccgggactggaacaatgaca
gtggagagcccaggactcgtaaccatggatcatcatgctcgtcatgatatcaatgttggca
caacacaggcacacgtgcatacacttcctcaggattacaagctcctcccgcgttagaacc
atatcccagggaacaacccattcctgaatcagcgtaaatcccacactgcagggaagacct
cgcacgtaactcacgttgtgcattgtcaaagtgttacattcgggcagcagcggatgatcct
ccagtatggtagcgcgggtttctgtctcaaaaggaggtagacgatccctactgtacggagt
gcgccgagacaaccgagatcgtgttggtcgtagtgtcatgccaaatggaacgccggacg
tagtcatatttcctgaagcaaaaccaggtgcgggcgtgacaaacagatctgcgtctccggt
ctcgccgcttagatcgctctgtgtagtagttgtagtatatccactctctcaaagcatccaggc
gccccctggcttcgggttctatgtaaactccttcatgcgccgctgccctgataacatccacc

[0250]

	accgcagaataagccacacccagccaacctacacattcgttctgcgagtcacacacgggaggagcgggaagagctggaagaaccatgtttttttttttattccaaaagattatccaaaacctcaaaatgaagatctattaagtgaacgcgctcccctccggtggcgtggtcaaactctacagccaaagaacagataatggcatttgtaagatgttgcacaatggcttccaaaaggcaaacggccctcacgtccaagtggacgtaaaggctaaacccttcagggtgaatctcctctataaacattccagcaccttcaaccatgcccaaataattctcatctcgccaccttctcaatatatctctaagcaaatcccgaatattaagtccggccattgtaaaaatctgctccagagcgccctccaccttcagcctcaagcagcgaatcatgattgcaaaaattcaggttcctcacagacctgtataagattcaaaagcggaacattaacaaaaataccgcgatcccgtaggtcccttcgcagggccagctgaacataatcgtgcaggtctgcacggaccagcgcggccacttccccgccaggaaccatgacaaaagaacccacactgattatgacacgcatactcggagctatgctaaccagcgtagccccgatgtaagcttgttgcatgggcggcgatataaaatgcaaggtgctgctcaaaaaatcaggcaaagcctcgcgcaaaaaagaaagcacatcgtagtcatgctcatgcagataaaggcaggtaagctccggaaccacacagaaaaagacaccatttttctctcaaacatgtctgcgggtttctgcataaacacaaaataaaataacaaaaaaacatttaaacattagaagcctgtcttacaacaggaaaaacaacccttataagcataagacggactacggccatgccggcgtgaccgtaaaaaaactggtcaccgtgattaaaaagcaccaccgacagctcctcggtcatgtccggagtcataatgtaagactcggtaaacacatcaggttgattcacatcggtcagtgctaaaaagcgaccgaaatagcccgggggaatacatacccgcaggcgtagagacaacattacagcccccataggaggtataacaaaattaataggagagaaaaacacataaacacctgaaaaaccctcctgcctaggcaaaatagcaccctcccgctccagaacaacatacagcgcttccacagcggcagccataacagtcagccttaccagtaaaaaagaaaacctattaaaaaaacaccactcgacacggcaccagctcaatcagtcacagtgtaaaaaagggccaagtgcagagcgagtatatataggactaaaaaatgacgtaacggttaaagtccacaaaaaacacccagaaaaccgcacgcgaacctacgcccagaaacgaaagccaaaaaacccacaacttcctcaaatcgtcacttccgttttcccacgttacgtcacttcccattttaagaaaactacaattcccaacacatacaagttactccgccctaaaacctacgtcacccgccccgttcccacgccccgcgccacgtcacaaactccacccccctcattatcatattggcttcaatccaaaataaggtatattattgatgatgttaattaacatgcatggat	
49	acggcggggttttacgagattgtgattaaggtccccagcgaccttgacgggcatctgcccggcatttctgacagctttgtgaactgggtggccgagaaggaatgggagttgccgccagatctgacatggatctgaatctgattgagcaggcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaatggcgccgtgtgagtaaggccccggaggccctttttctttgtgcaatttgagaagggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccggggtgaaatccatggttttgggacgtttcctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaatttaccgcgggatcgagccgactttgccaaactggttcgcggtcacaaagaccagaaatggccgccggaggcgggaacaaggtggtggatgagtgctacatccccaattacttgctccccaaaacccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagtatttaagcgcctgtttgaatctcacggagcgtaaacggttggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaacaaagagaatcagaatcccaattctgatgcgccggtgatcagatcaaaaacttcagccaggtacatggagctggtcgggtggctcgtggacaaggggattacctcggaga	Rep 2

		agcagtggatccaggaggaccaggcctcatacatctccttcaatgcggcctccaactcgc ggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgcgggaaagattatgagcctgactaaaacc gcccccgactacctggtgggccagcagcccgtggaggacatttccagcaatcggatttat aaaattttggaactaaacgggtacgatccccaatatgcggcttccgtctttctgggatgggc cacgaaaaagttcggcaagaggaacaccatctggctgtttgggcctgcaactaccggga agaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgcccttctacgggtgcgtaaactgg accaatgagaactttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtgggaggag gggaagatgaccgccaaggtcgtggagtcggccaaagccattctcggaggaagcaag gtgcgcgtggaccagaaatgcaagtcctcggcccagatagacccgactcccgtgatcgt cacctccaacaccaacatgtgcgccgtgattgacgggaactcaacgaccttcgaacacc agcagccgttgcaagaccggatgttcaaatttgaactcacccgccgtctggatcatgactt tgggaaggtcaccaagcaggaagtcaaagacttttccggtgggcaaaggatcacgtgg ttgaggtggagcatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagacccgccccc agtgacgcagatataagtgagcccaaacgggtgcgcgagtcagttgcgcagccatcga cgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggtaccaaaacaaatgttctcgtc acgtgggcatgaatctgatgctgtttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattc aaatatctgcttcactcacggacagaaagactgtttagagtgctttcccgtgtcagaatctc aacccgtttctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatcatatcatggga aaggtgccagacgcttgcactgcctgcgatctggtcaatgtggatttggatgactgcatctt tgaacaataa	
[0251]	50	atggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacactctctctgaaggaataagac agtggtggaagctcaaacctggcccaccaccaccaaagcccgcagagcggcataagg acgacagcaggggtcttgtgcttcctgggtacaagtacctcggacccttcaacggactcg acaagggagagccggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacgacaaagcc tacgaccggcagctcgacagcggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgccgacg cggagtttcaggagcgccttaaagaagatacgtcttttgggggcaacctcggacgagca gtcttccaggcgaaaaagagggttcttgaacctctgggcctggttgaggaacctgttaaga cggctccgggaaaaaagaggccggtagagcactctcctgtggagccagactcctcctc gggaaccggaaaggcgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaattttggtcagact ggagacgcagactcagtacctgaccccagcctctcggacagccaccagcagcccct ctggtctgggaactaatacgatggctacaggcagtggcgcaccaatggcagacaataac gagggcgccgacggagtgggtaattcctcgggaaattggcattgcgattccacatggat gggcgacagagtcatcaccaccagcacccgaacctgggccctgcccacctacaacaac cacctctacaaacaaatttccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcactactttggct acagcacccttggggtattttgacttcaacagattccactgccacttttcaccacgtgact ggcaaagactcatcaacaacaactggggattccgacccaagagactcaacttcaagctct ttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacggtacgacgacgattgccaataacc ttaccagcacggttcaggtgtttactgactcggagtaccagctcccgtacgtcctcggctc ggcgcatcaaggatgcctcccgccgttcccagcagacgtcttcatggtgccacagtatgg atacctcaccctgaacaacgggagtcaggcagtaggacgctcttcattttactgcctggag tactttccttctcagatgctgcgtaccggaaacaactttaccttcagctacacttttgaggac	AA V2 cap

[0252]

	gttcctttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatcctctcat cgaccagtacctgtattacttgagcagaacaaacactccaagtggaaccaccacgcagtc aaggcttcagttttctcaggccggagcgagtgacattcgggaccagtctaggaactggctt cctggaccctgttaccgccagcagcgagtatcaaagacatctgcggataacaacaacag tgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaat ccgggcccggccatggcaagccacaaggacgatgaagaaaagtttttttcctcagagcg gggttctcatctttgggaagcaaggctcagagaaaacaaatgtggacattgaaaaggtca tgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatcccgtggctacggagcagtatggt tctgtatctaccaacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacac acaaggcgttcttccaggcatggtctggcaggacagagatgtgtaccttcaggggcccat ctgggcaaagattccacacacggacggacattttcacccctctcccctcatgggtggattc ggacttaaacaccctcctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatcctt cgaccaccttcagtgcggcaaagtttgcttccttcatcacacagtactccacgggacaggt cagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaaacgctggaatcccga aattcagtacacttccaactacaacaagtctgttaatgtggactttactgtggacactaatgg cgtgtattcagagcctcgccccattggcaccagatacctgactcg	
51	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgagg ccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcg agcgagcgcgcagagagggagtggccaa	ITR
52	SAAGADXAXDS	

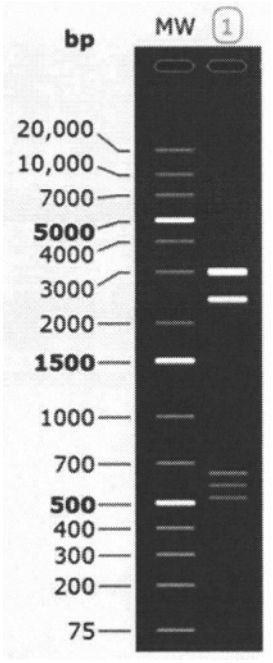

bp
MW
1
20,000
10,000
7000
5000
4000
3000
2000
1500
1000
700
500
400
300
200
75

图1A

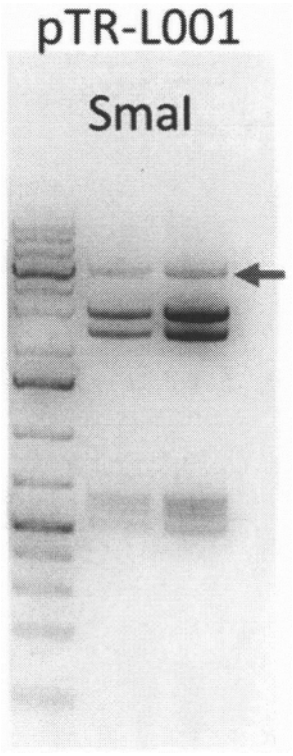

pTR-L001
SmaI

图1B

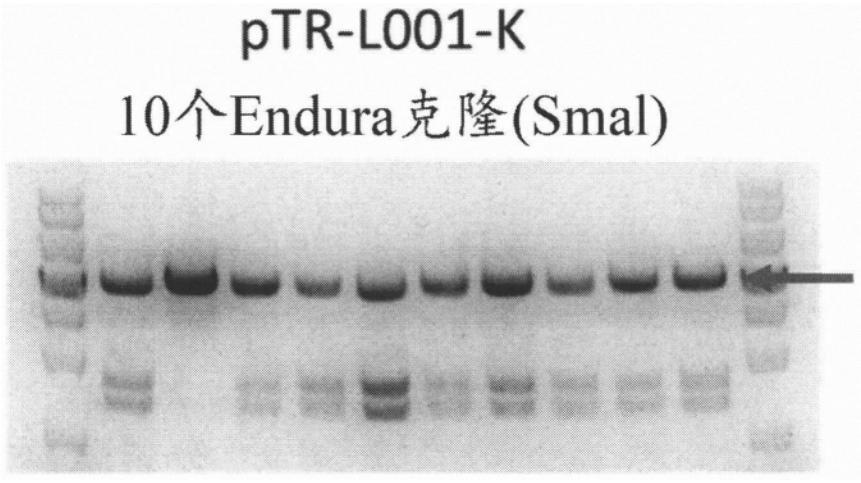

pTR-L001-K
10个Endura克隆(SmaI)

图1C

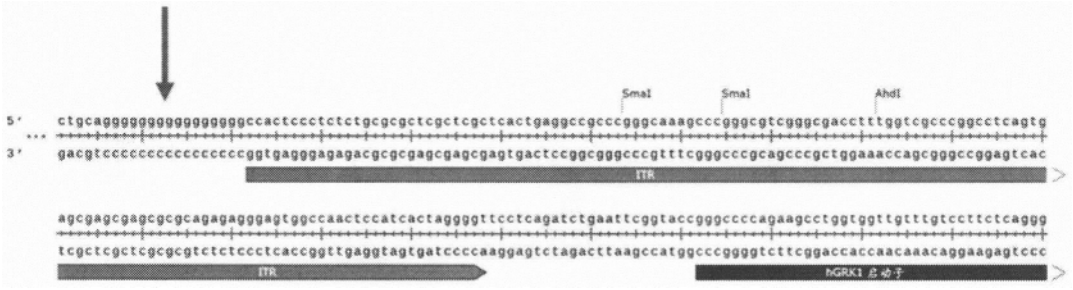

SmaI
SmaI
AhdI
5'
3'
ITR
ITR
hGRK1 启动子

图2A

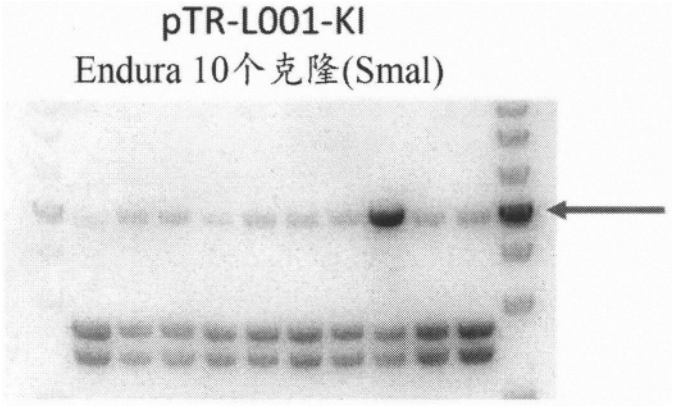

pTR-L001-KI
Endura 10个克隆(SmaI)

图2B

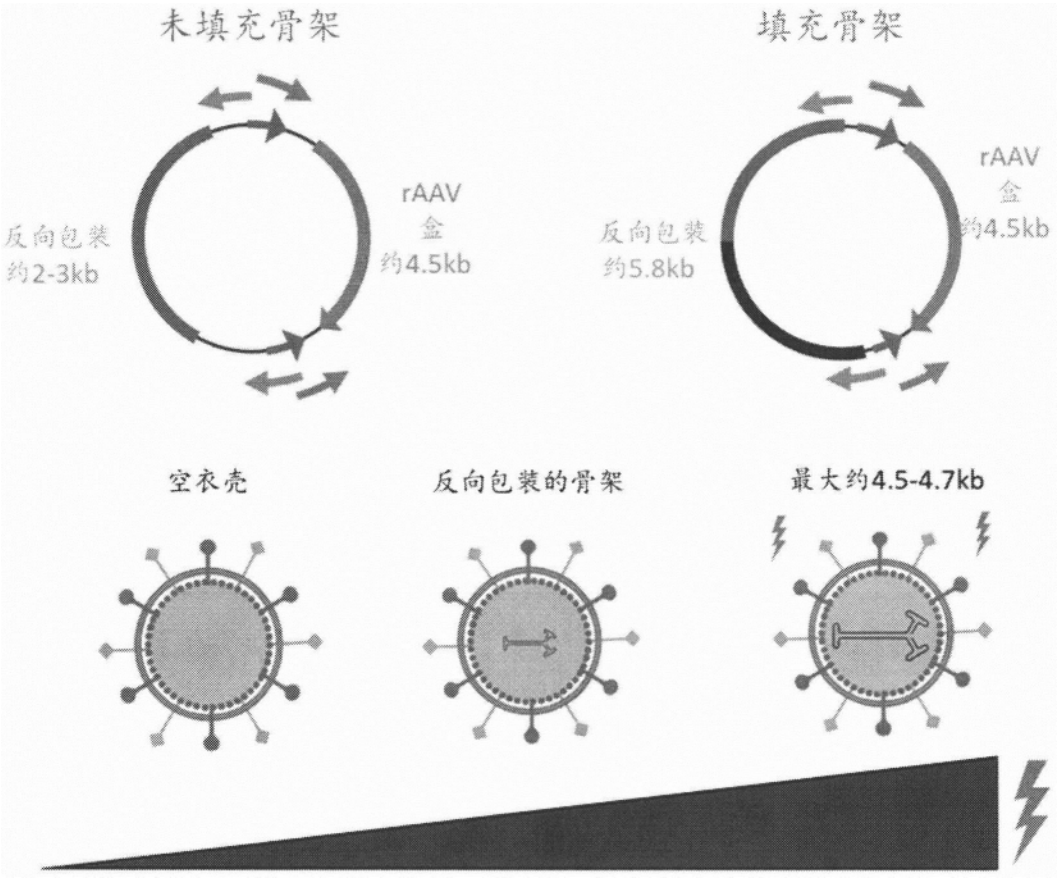

未填充骨架
反向包装
约2-3kb
rAAV
盒
约4.5kb
填充骨架
反向包装
约5.8kb
rAAV
盒
约4.5kb
空衣壳
反向包装的骨架
最大约4.5-4.7kb

图3

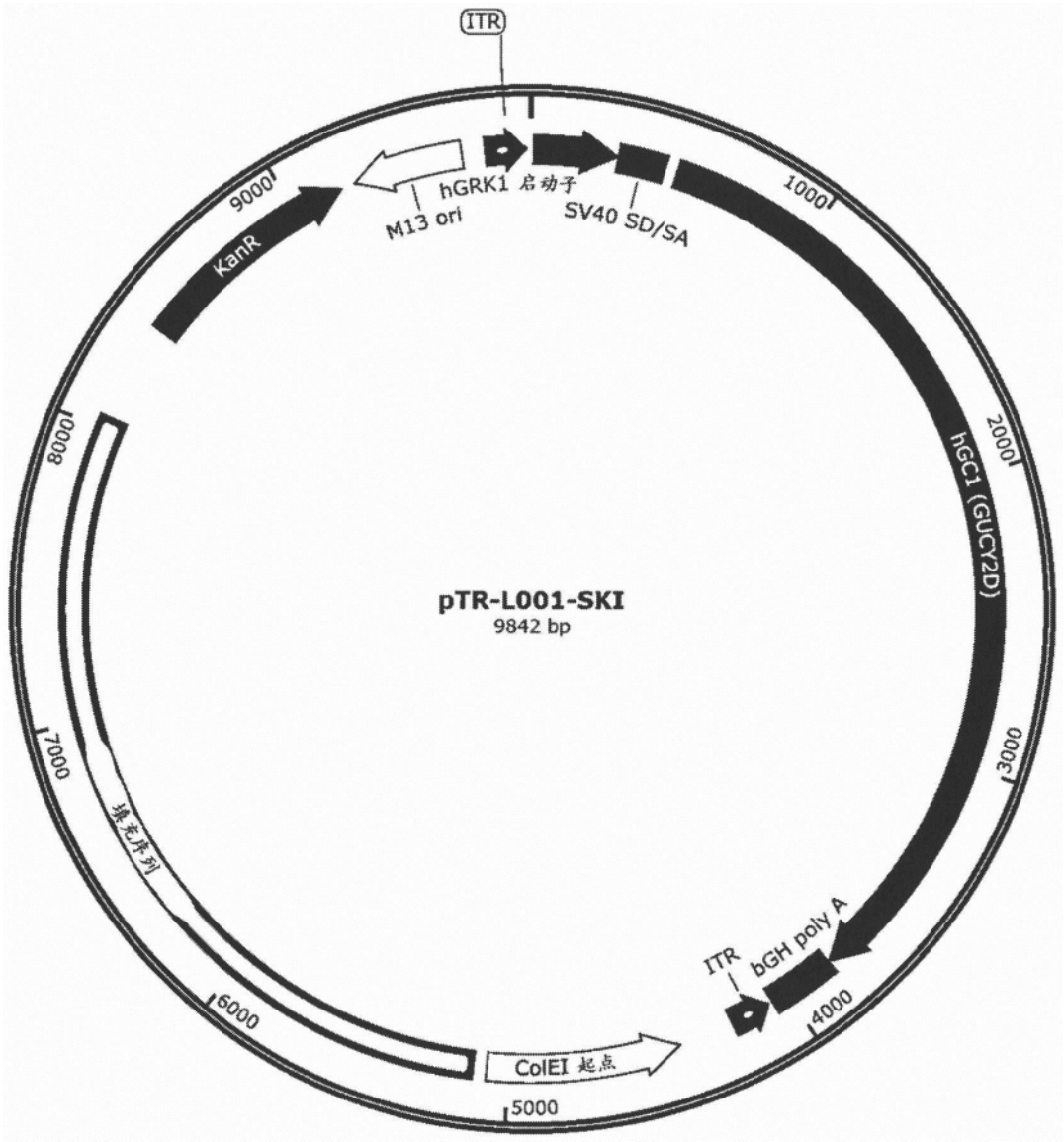

ITR
hGRK1 启动子
M13 ori
SV40 SD/SA
KanR
hGC1 (GUCY2D)
pTR-L001-SKI
9842 bp
填充序列
ITR
bGH poly A
ColEI 起点
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

图4A

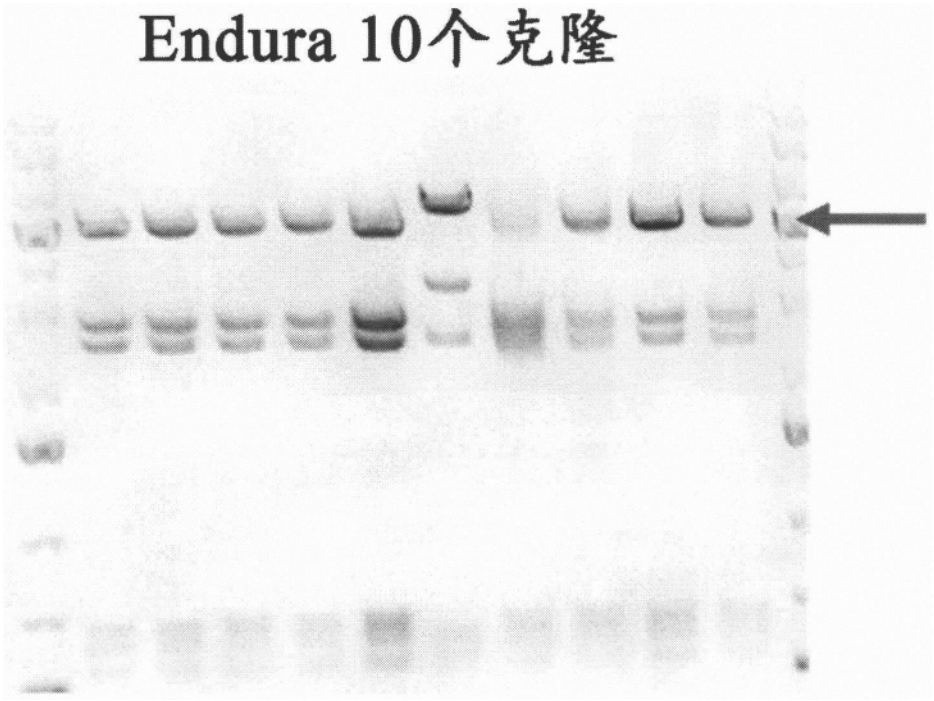


图4B

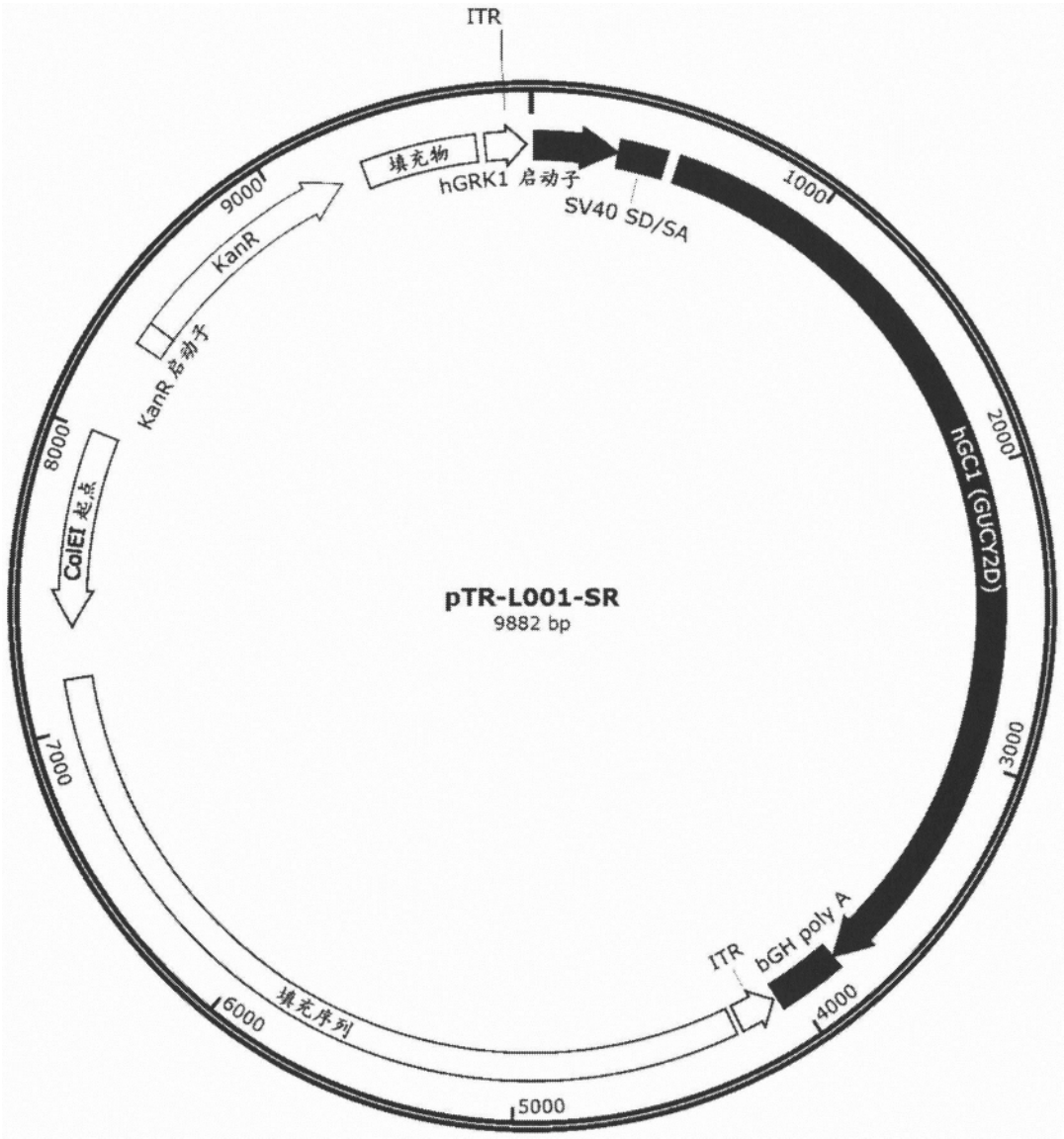

ITR
填充物
hGRK1 启动子
SV40 SD/SA
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000
KanR
KanR 启动子
ColE1 起点
hGC1 (GUCY2D)
pTR-L001-SR
9882 bp
ITR
bGH poly A
填充序列

图5A

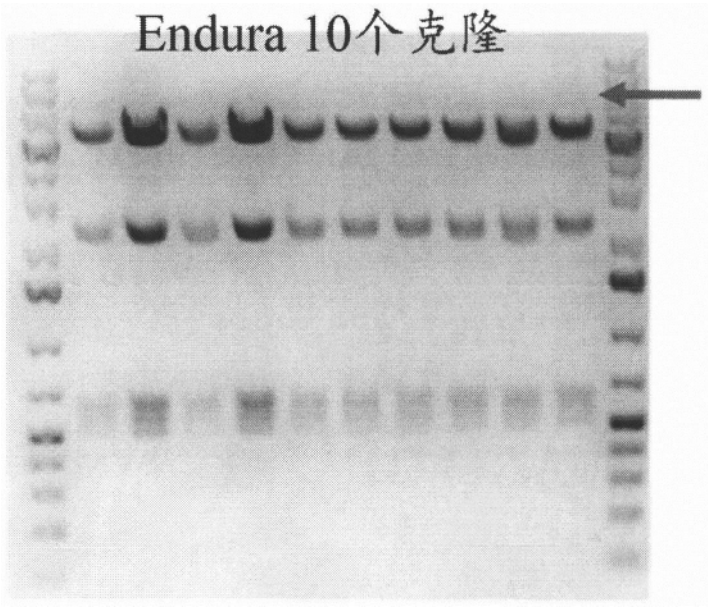


图5B

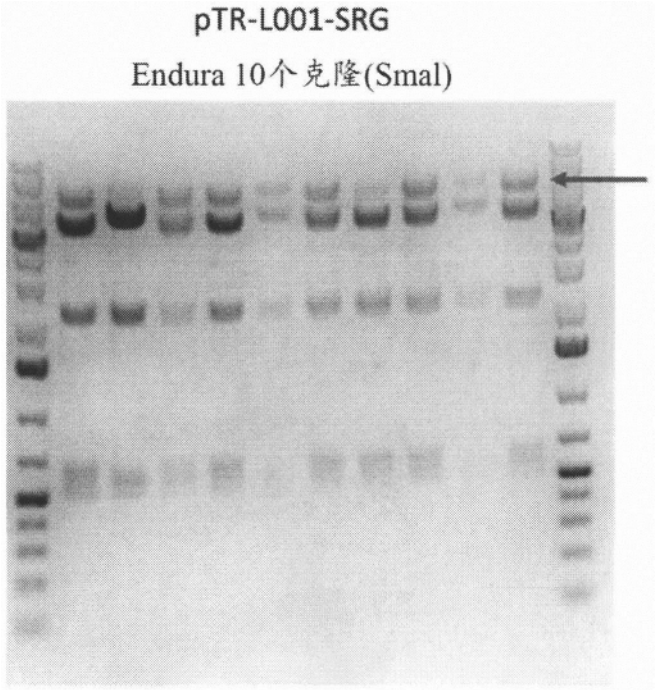


图6

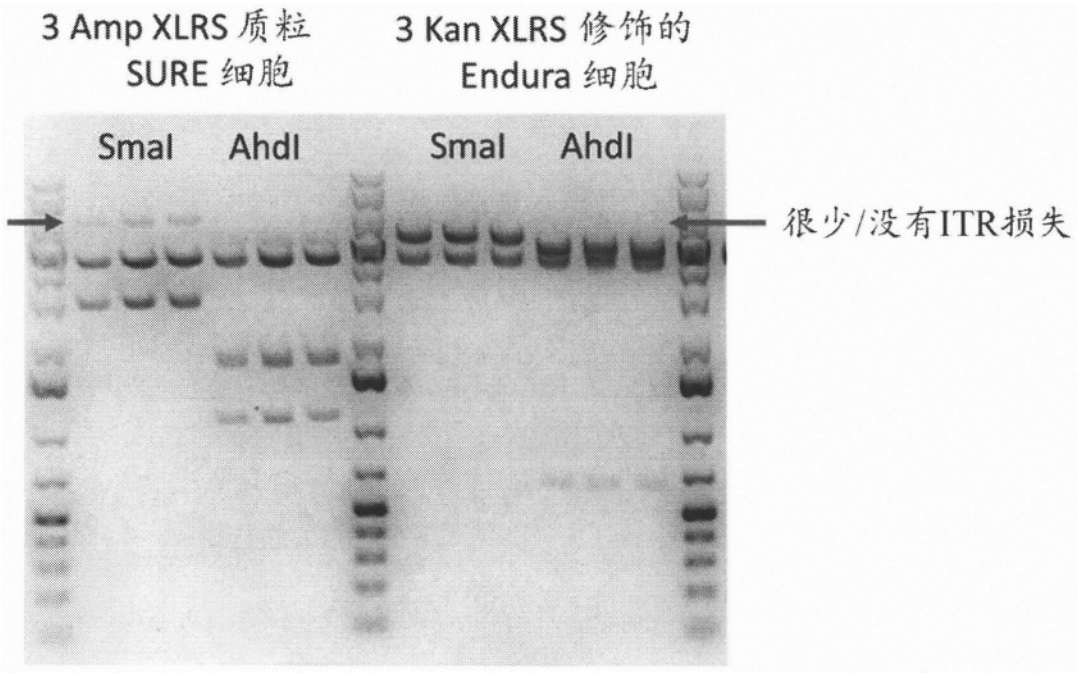

3 Amp XLRS 质粒
SURE 细胞
3 Kan XLRS 修饰的
Endura 细胞
SmaI
AhdI
SmaI
AhdI
很少/没有ITR损失

图7

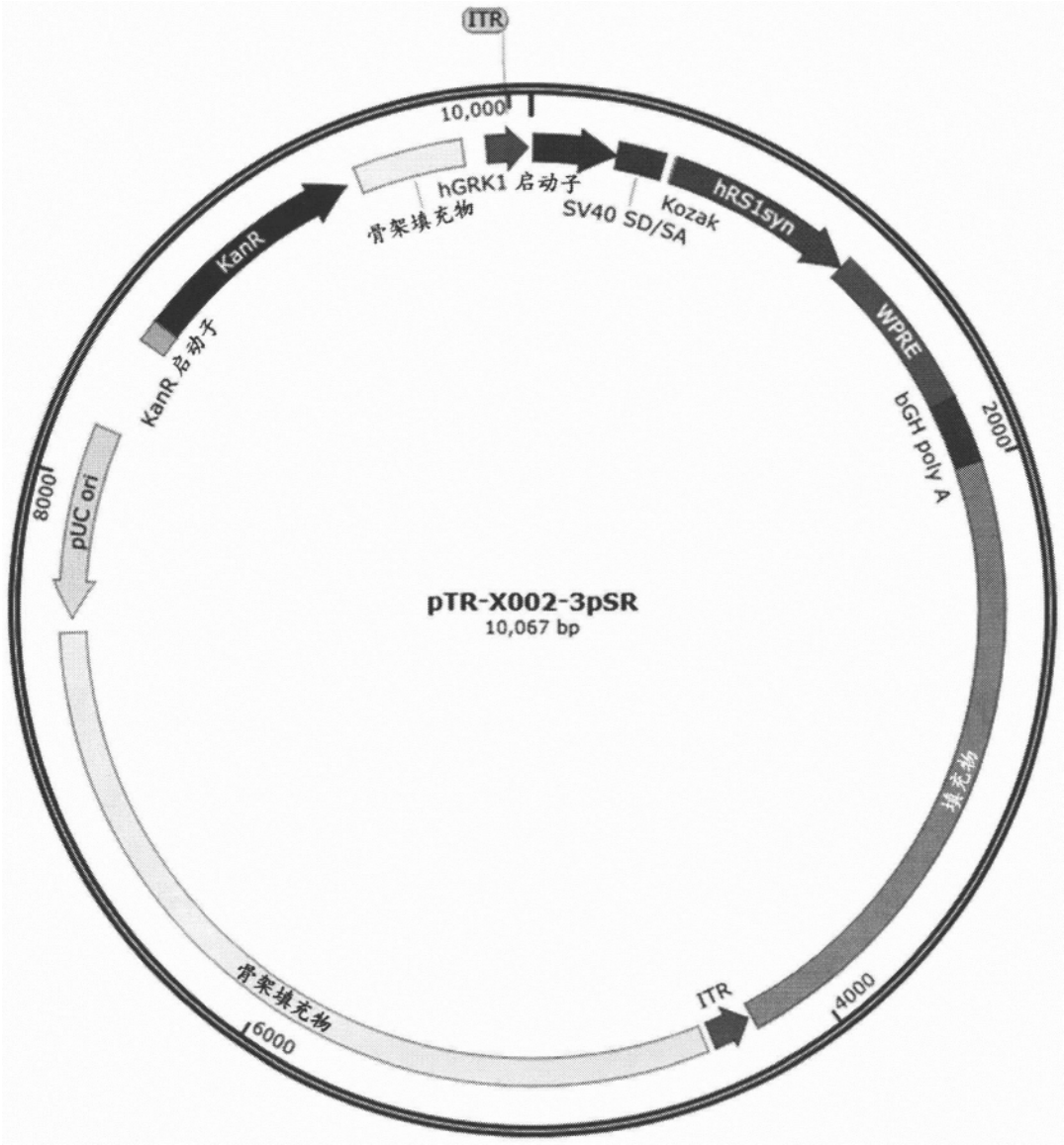

ITR
10,000
hGRK1 启动子
骨架填充物
SV40 SD/SA
Kozak
hRS1syn
WPRE
bGH poly A
2000
KanR
KanR启动子
8000
pUC ori
pTR-X002-3pSR
10,067 bp
骨架填充物
6000
ITR
4000
填充物

图8A

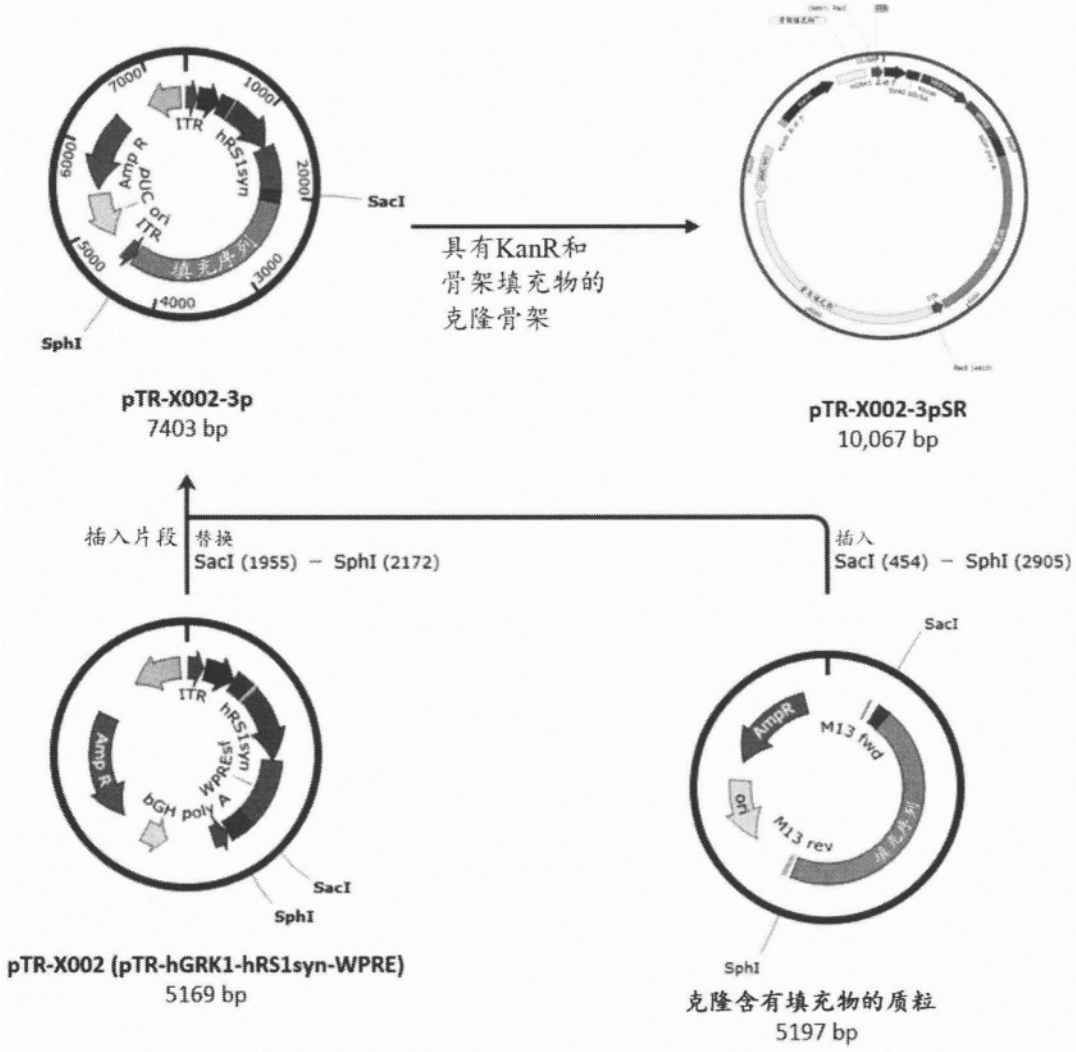

7000
1000
2000
3000
4000
5000
6000
ITR
hRS1syn
Amp R
pUC ori
ITR
填充序列
SacI
SphI
pTR-X002-3p
7403 bp
具有KanR和
骨架填充物的
克隆骨架
pTR-X002-3pSR
10,067 bp
插入片段
替换
SacI (1955) – SphI (2172)
插入
SacI (454) – SphI (2905)
ITR
hRS1syn
WPRE
bGH poly A
Amp R
SacI
SphI
pTR-X002 (pTR-hGRK1-hRS1syn-WPRE)
5169 bp
SacI
AmpR
M13 fwd
ori
M13 rev
填充序列
SphI
克隆含有填充物的质粒
5197 bp

图8B

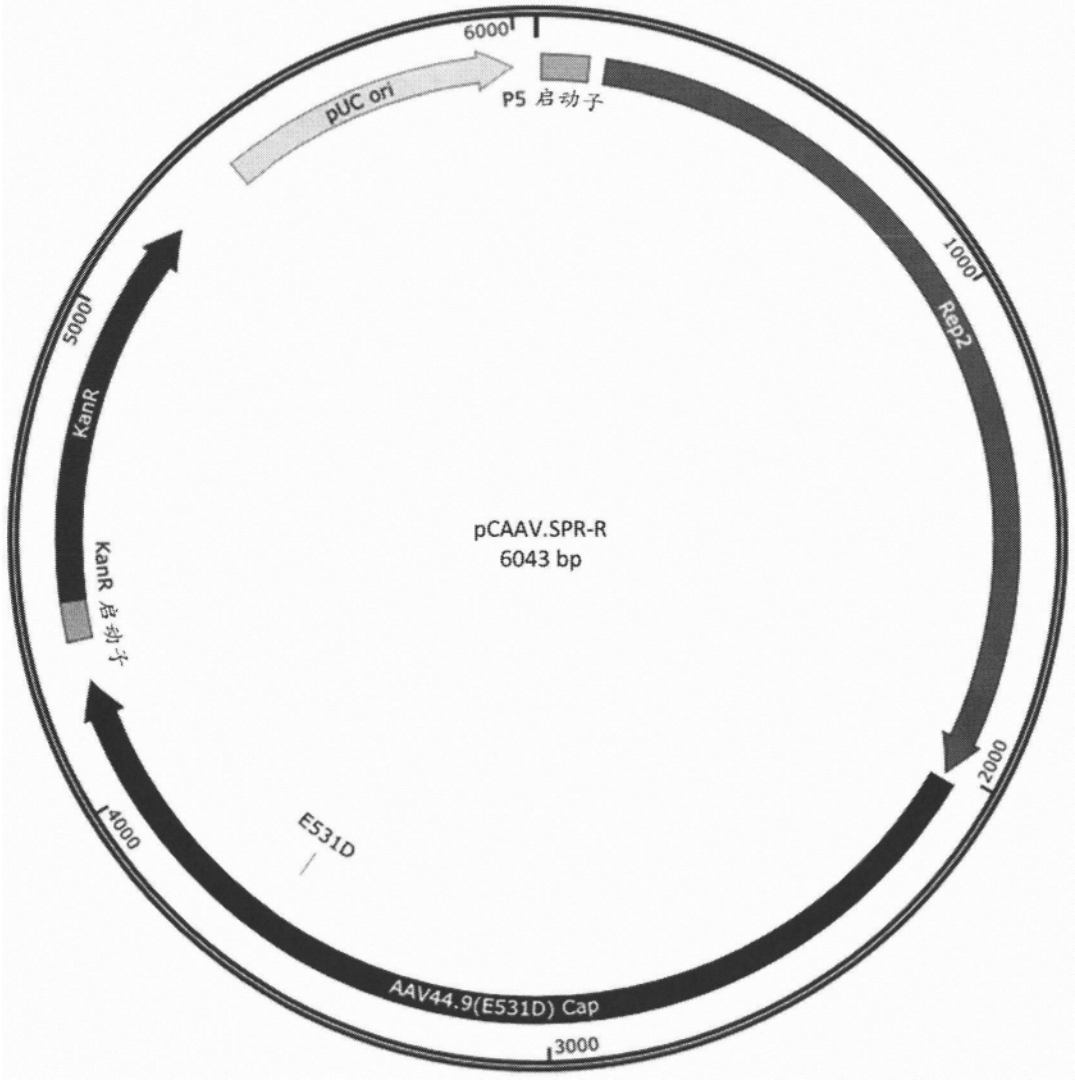

6000
pUC ori
P5 启动子
1000
Rep2
2000
AAV44.9(E531D) Cap
3000
4000
E531D
5000
KanR
KanR 启动子
pCAAV.SPR-R
6043 bp

图8C

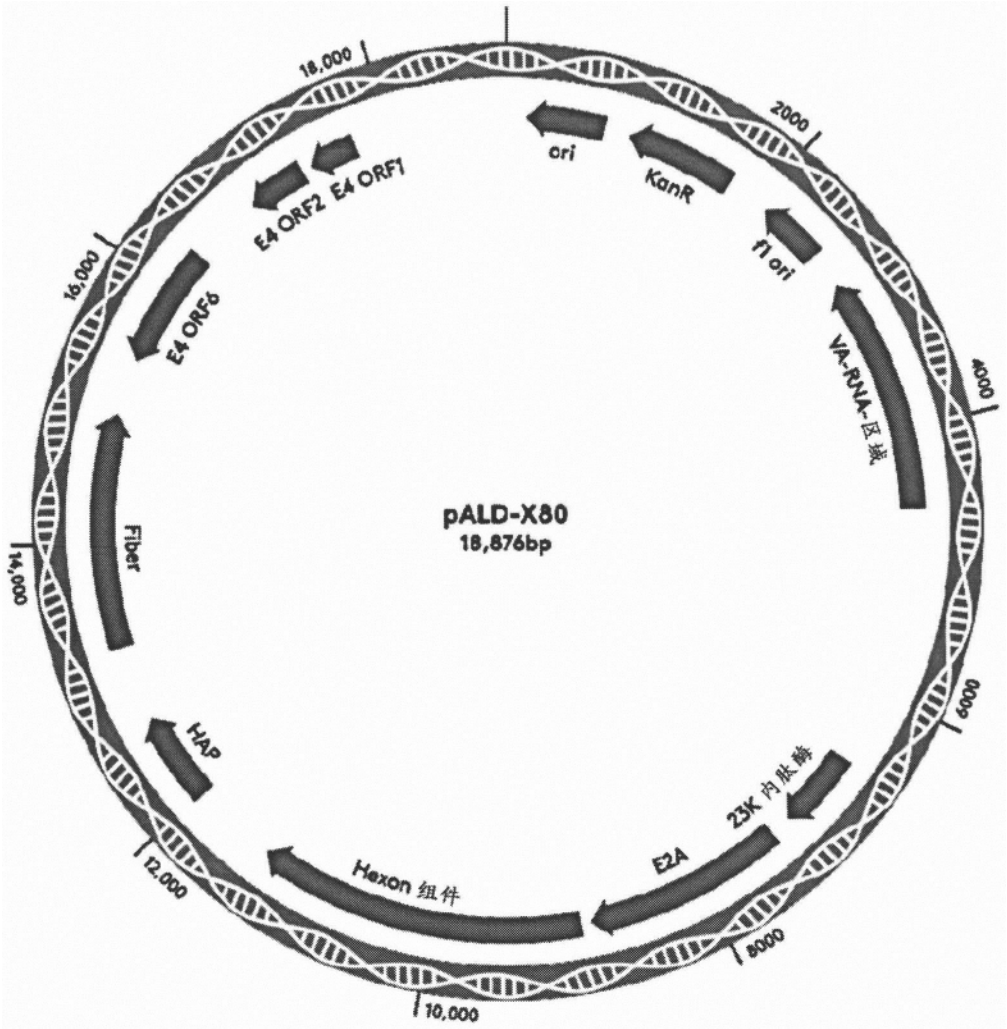

pALD-X80
18,876bp
ori
KanR
f1 ori
VA-RNA-区域
E2A
23K 肉肽酶
Hexon 组件
HAP
Fiber
E4 ORF6
E4 ORF2
E4 ORF1
2000
4000
6000
8000
10,000
12,000
14,000
16,000
18,000

图8D

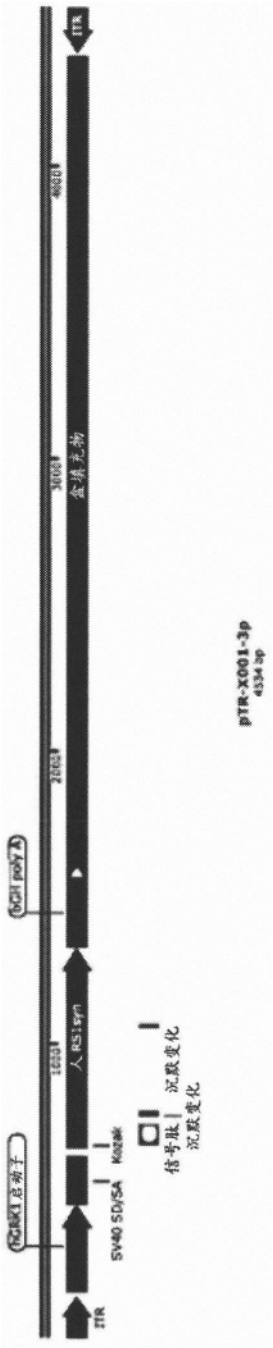


图9A

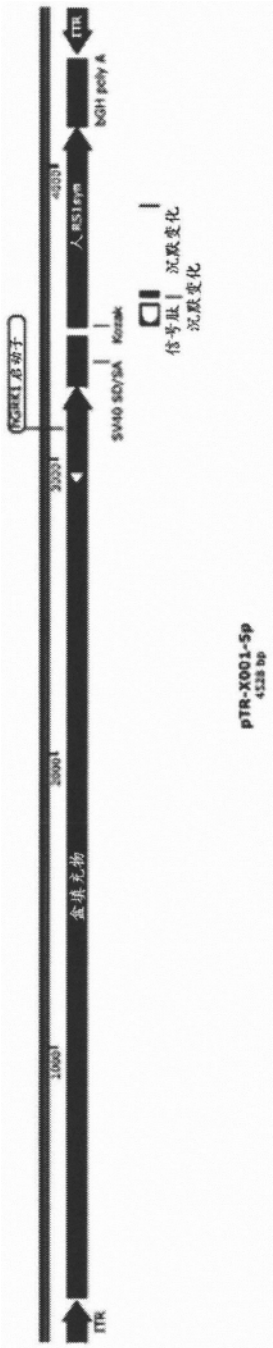

ITR
1000
2000
3000
4000
ITR
金填充物
SV40 SD/SA
Kozak
人 RS1 syn
bGH poly A
信号肽
沉默变化
沉默变化
pTR-X001-Sp
4528 bp

图9B

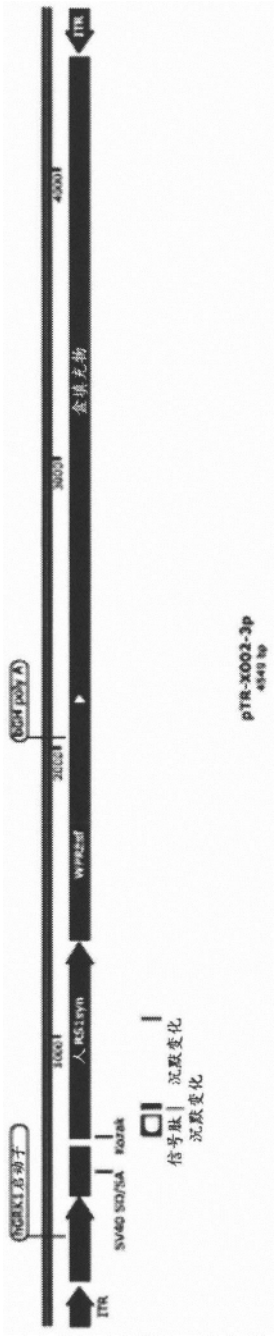

ITR
SV40 SD/SA
Kozak
信号肽
沉默变化
沉默变化
人 RS1 syn
WPRE
1000
2000
3000
4000
ITR
pTR-X002-3p

图9C

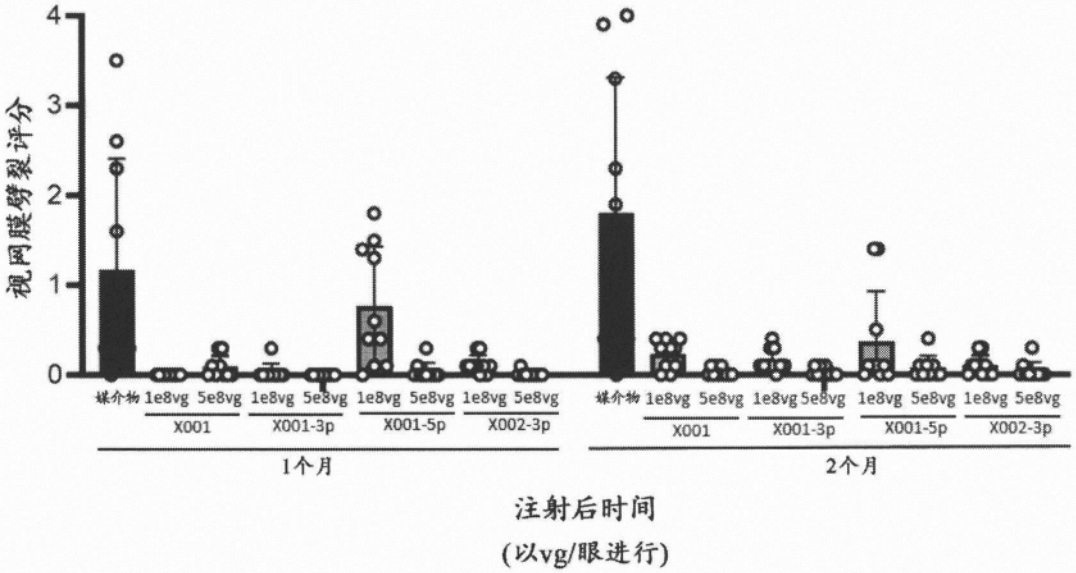

视网膜劈裂评分
4
3
2
1
0
媒介物
1e8vg
5e8vg
X001
X001-3p
X001-5p
X002-3p
1个月
2个月
注射后时间
(以vg/眼进行)

图10

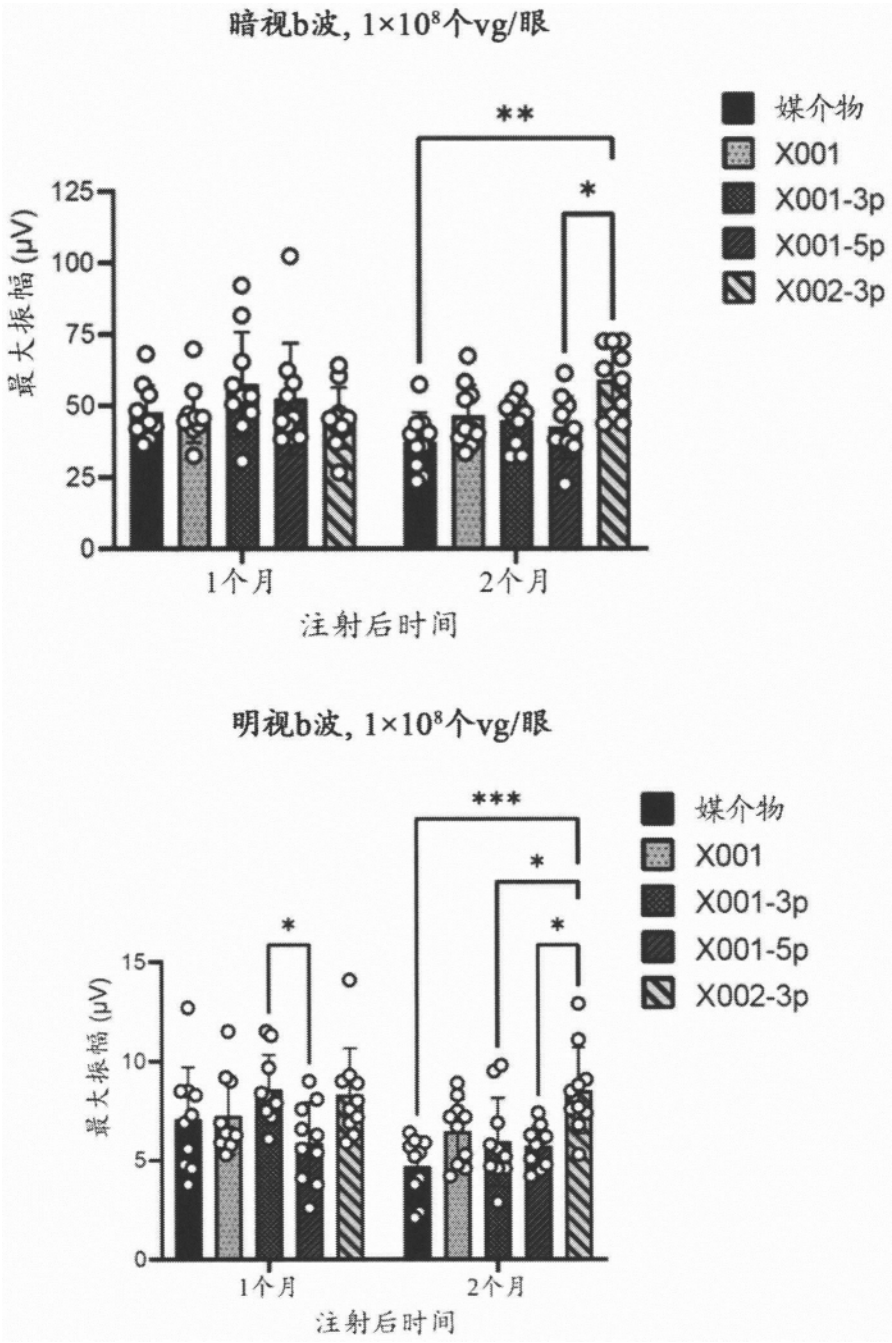

暗视b波, 1×10⁸个vg/眼
**
*
媒介物
X001
X001-3p
X001-5p
X002-3p
最大振幅 (μV)
125
100
75
50
25
0
1个月
2个月
注射后时间
明视b波, 1×10⁸个vg/眼
***
*
*
*
媒介物
X001
X001-3p
X001-5p
X002-3p
最大振幅 (μV)
15
10
5
0
1个月
2个月
注射后时间

图11A

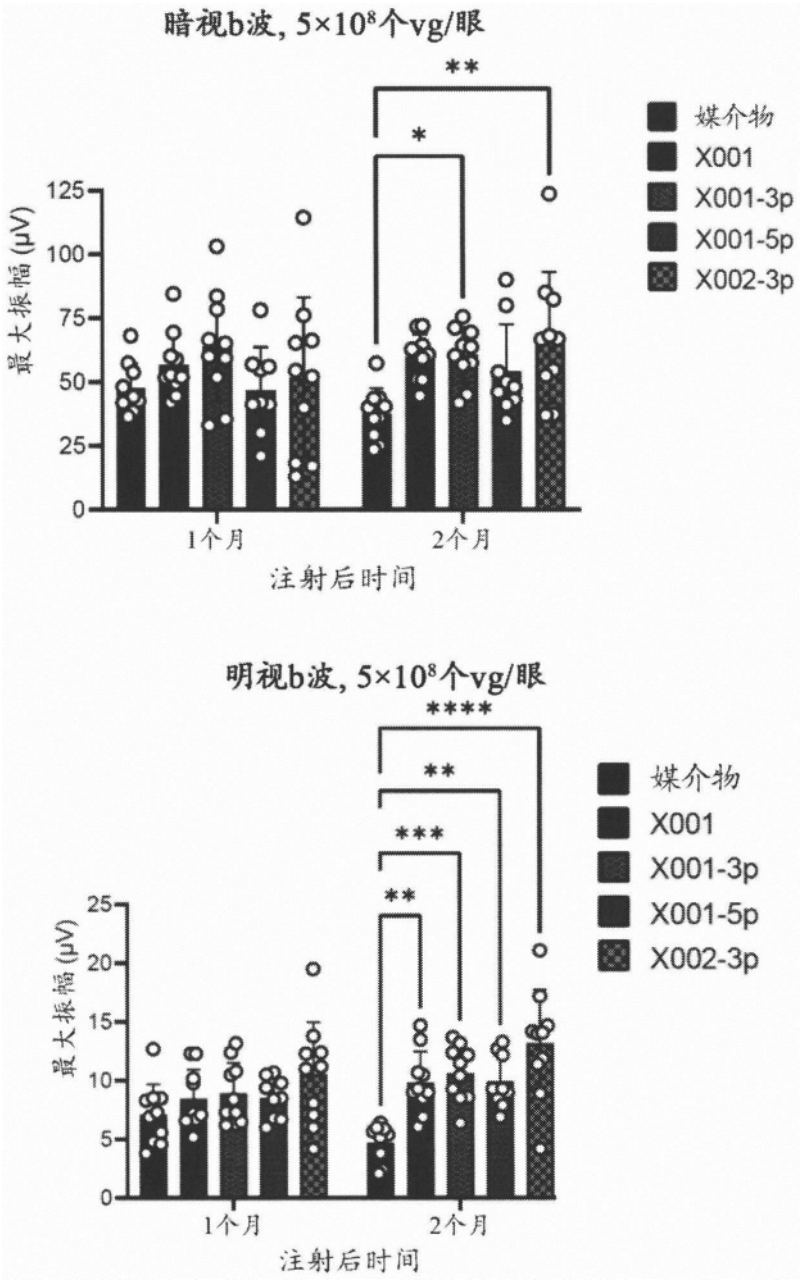

暗视b波, 5×10⁸个vg/眼
**
*
媒介物
X001
X001-3p
X001-5p
X002-3p
最大振幅 (μV)
125
100
75
50
25
0
1个月
2个月
注射后时间
明视b波, 5×10⁸个vg/眼
****
**
***
**
媒介物
X001
X001-3p
X001-5p
X002-3p
最大振幅 (μV)
25
20
15
10
5
0
1个月
2个月
注射后时间

图11B

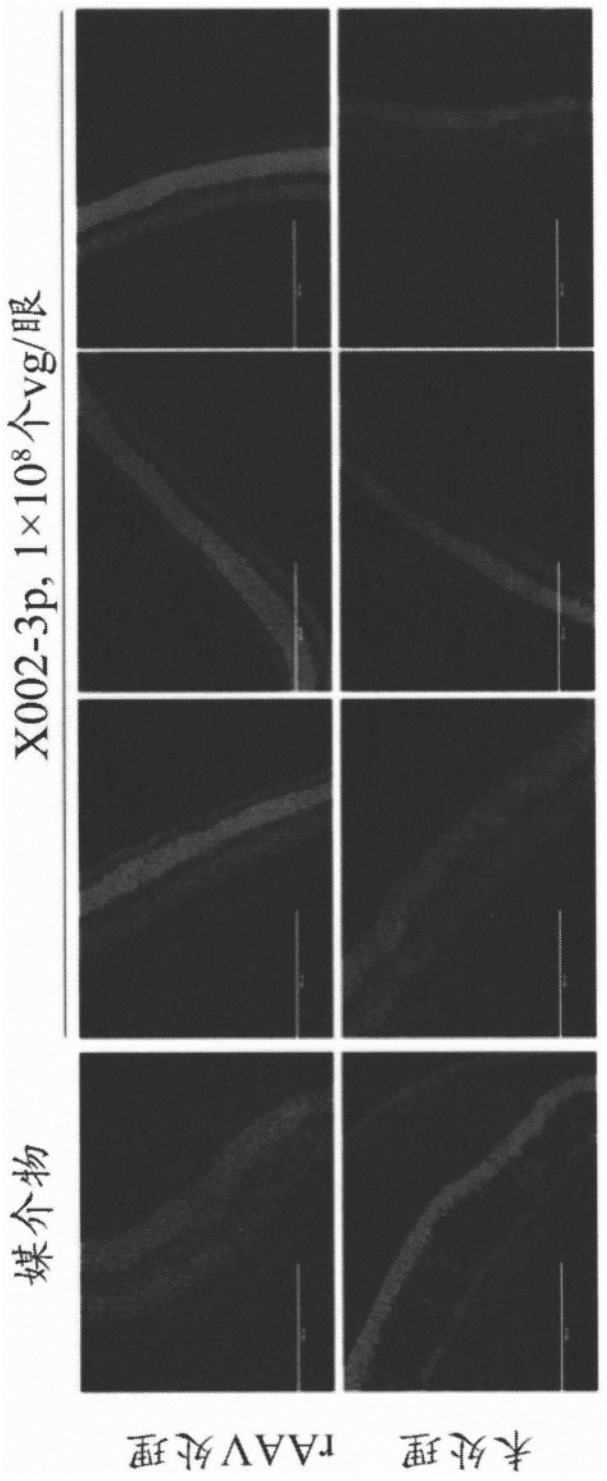


图12A

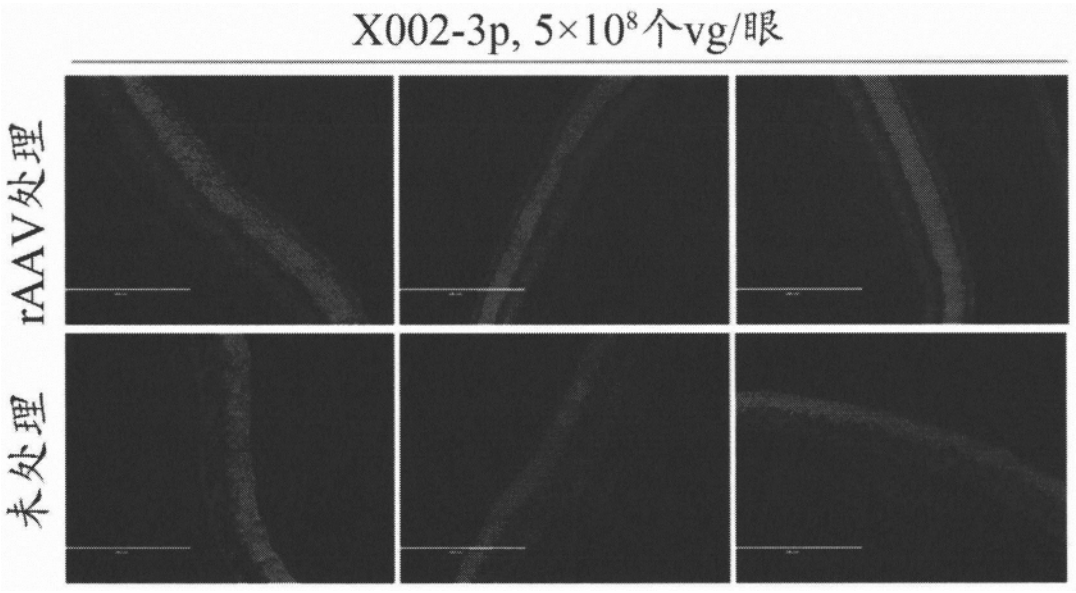


图12B